台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.70 No.1 2021

Research Articles

1 A Simple and Economical Method to Induce Sporulation of *Pyricularia oryzae*

Yi-Nian Chen, Dong-Hong Wu, Mei-Chun Chen, and Pei-Chen Chen

11 Application of Plant Phenomics Platform for Automatic Phenotyping of the Vegetable Crops

Ssu-Yu Lin, Yuan-Kai Tu, Shuen-Chi You, Yue-Ying Fu, and Da-Gin Lin

24 Biological Control of Potato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01

Zen-Chi Huang, Ya-Fang Wu, Chia-Hsin Tsai, Hau-Ping Chou, Yi-Hsien Lin, and Ying-Lien Chen

43 Evaluation of Control Efficacy of 4-4 Bordeaux Mixture Against Coffee Rust

Hui-Fang Ni, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, Shu-Fen Chang, and Ching-Yi Lin

54 Habitat Selection of the Eastern Spot-billed Duck (*Anas zonorhyncha*) in Rice Paddies during the Seedling Transplanting Period

Mei-Jhu Hong, Shih-Han Hsu, Shin-Han Tseng, and Chao-Nien Koh

67 Identification and Biological Characteristics of Cowpea Mild Mottle Virus in Taiwan

Ying-Huey Cheng, Chin-Chih Chen, Lan-Yi Chien, and Chin-An Chang

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.70 No.1 2021

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.70 No.1 2021

研究報告

1 簡易經濟的稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*) 產孢誘導方法

陳繹年、吳東鴻、陳美君、陳珮臻

11 植物表型體分析平台於蔬菜自動外表型分析之應用

林思妤、杜元凱、游舜期、傅月英、林大鈞

24 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 防治馬鈴薯青枯病之探討

黃仁麒、吳雅芳、蔡佳欣、周浩平、林宜賢、陳穎練

43 4-4 式波爾多液對咖啡銹病防治效果評估

倪蕙芳、許淑麗、賴素玉、張淑芬、林靜宜

54 花嘴鴨對插秧期水稻田的棲地選擇

洪美珠、許詩涵、曾信翰、葛兆年

67 豇豆微斑駁病毒之鑑定與生物特性分析

鄭櫻慧、陳金枝、簡蘭懿、張清安

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

申雍／國立中興大學土讓環境科學系
謝廷芳／農業試驗所植物病理組

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第七十卷　第一期　　中華民國一一〇年三月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　楊純明
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):1–10 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0001

Research Article

A Simple and Economical Method to Induce Sporulation of *Pyricularia oryzae*

Yi-Nian Chen[1], Dong-Hong Wu[2], Mei-Chun Chen[3], and Pei-Chen Chen[4,*]

Abstract

Chen, Y. N., D. H. Wu, M. C. Chen, and P. C. Chen. 2021. A simple and economical method to induce sporulation of *Pyricularia oryzae*. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):1–10.

It requires a large number of conidia not only for pathogenic races identification of *Pyricularia oryzae* (the causal agent of rice blast) but also for disease resistance assessment of rice varieties against the pathogen. For stable test result, the same age of conidiospores are also essential for these pathogenicity tests. A mycelial homogenate method (called "liquid spawn method") modified from the IRRI (International Rice Research Institute) protocol was used to induce simultaneous conidia production of rice blast fungus. The processes are: (1) 4-d-old colony of *P. oryzae* isolate was cut into numerous pieces and cultured in prune broth for 4 d; (2) homogenizing the whole broth, dispersing the liquid spawn evenly on oat flour agar (OFA) medium plate, air-drying the excess water on the plate, and then culturing the medium at room temperature with natural light illumination for 4 d for conidia production. By use of this method, the conidia yield of several tested isolates of *P. oryzae* were much higher (2−31 folds) than those with IRRI protocol. In another test, 14 *P. oryzae* isolates which had very poor conidia yields with regular methods produced significantly higher number of conidia by the method. The results showed that the liquid spawn method could be used for simultaneous and massive sporulation of *P. oryzae*.

Key words: *Pyricularia oryzae*, Sporulation, Conidia, Liquid spawn, Oat flour agar.

INTRODUCTION

Rice is the third most important staple food crop in the world, and also the main source of dietary energy for more than half of the world's population. There are approximately 271,506 ha of rice-cultivated area in Taiwan producing an annual output value over 42.9 billion NT dollars. Rice blast disease, caused by *Pyricularia oryzae* Cavara (Teleomorph: *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch), is one of the major fungal diseases in various rice-growing regions worldwide (Agrios 1997). If the damage occurs at the flowering stage, the rice yield will be severely affected. Average annual production loss due to rice blast disease is ranged from 10% to 30% globally, depending on the differences in the planting environment and cultivars (Talbot 2003; Skamnioti & Gurr 2009). In some areas of the world, even 50% to 90% yield loss has been reported (Hajanoe *et al*. 2011).

P. oryzae has many known races, which can affect different rice cultivars. To avoid severe damages due to *P. oryzae*, it is imperative to monitor the pathotypes and distribution of the virulent rice blast fungus in fields (Chen *et al*. 2013). In principle, to maintain the objectivity

Received: September 30, 2020; Accepted: December 25, 2020.
* Corresponding author, e-mail: janetchen@nchu.edu.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
4 Associate Professor, Department of Plant Pathology, National Chun Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.

and credibility of the pathotypes distribution, different *P. oryzae* isolates must be collected from various production areas for pathogenicity evaluation. However, some *P. oryzae* isolates have poor sporulation capability to produce sufficient conidia for inoculation tests (Koga *et al.* 2008). Therefore, developing a reliable method to stimulate the conidia production of *P. oryzae* is critical for the evaluation of pathogenicity of rice blast fungus.

Many environmental factors including nutrients, temperature, humidity, and light conditions may affect the sporulation of *P. oryzae* (Hemmi & Imura 1939; Namai & Yamanaka 1985; Lee *et al.* 2006; Rajput *et al.* 2017). The reported optimal temperature suitable for *P. oryzae* conidial production is around 28℃ to 30℃ and the relative humidity higher than 93% (Hemmi & Imura 1939; Netam *et al.* 2013). Several media, including potato dextrose agar (PDA), oatmeal agar (OMA), rice flour agar, yeast extract starch agar (YSA) and prune agar (PA) are commonly used for *P. oryzae* to stimulate sporulation (Hayashi *et al.* 2009; Lan *et al.* 2012; Hajano *et al.* 2013). Although the light was not an essential factor for *P. oryzae* sporulation (Chakrabarti & Wilcoxson 1970), exposure of fungal cultures to light during the first few days can stimulate conidiophore formation (Namai *et al.* 1977) and conidia production. Further studies have found that *P. oryzae* isolates kept under 8/16 h of light/dark photoperiod could significantly increase the conidia production (Hajano *et al.* 2013). However, none of the reported methods is suitable for all *P. oryzae* isolates.

The mycelial plug method is the most commonly used method for many fungi to obtain spores (Hau & Rush 1980; Lan *et al.* 2012; Chaudhary *et al.* 2018). The drawback of this method is that spores in a cultural plate are produced at varying time. Lack of uniformity in spore ages may impact the results of fungal pathogenicity, let along many isolates of *P. oryzae* fail to produce spores using the mycelial plug method. A stimulating sporulation method originally reported by Hayashi *et al.* (2009) is commonly used by researchers in the International Rice Research Institute (IRRI). Although the IRRI protocol improves the conidial yield and reduces the age variation of spore, it has a risk of contamination during the culture process.

The main objective of this study was to develop a universal protocol suitable for conidia production by most field-collected isolates of *P. oryzae*, and the two methods mentioned above were included as references in this study.

MATERIALS AND METHODS

Comparison of sporulation among the liquid spawn, IRRI protocol, and the agar plug method

Three *P. oryzae* isolates with different sporulation abilities based on the conventional agar plug method were used in this study. Isolates YL2a3-1603 and TJ4a3-1603 from diseased rice seedlings were collected from Yuanli and Tianjung Townships, respectively, in March 2016. PT5a5-1205, which sporulated poorly was originated from the infected leaf of Pitou Township at vegetative stage in May 2012. The average conidia yields of YL2a3-1603, TJ4a3-1603 and PT5a5-1205 were 2.0×10^5, 1.7×10^5 and 4.0×10^4 conidia per 9-cm diameter plate, respectively. All isolates were preserved on filter papers and stored at -20℃. The production of conidia was carried out by growing fungal isolates from the stock culture.

In IRRI protocol, *P. oryzae* mycelium cultured on the PA slant for 10 d and a 2-mL of the mycelial suspensions from the PA slants was uniformly spread on a new PA medium plate and incubated at 27℃ for 7 d. After aerial hyphae were scrapped by sterilized glass slides, the plates were left open under the fluorescent lamp at about 27℃ for 4 d to induce sporulation. The tested method (called "liquid spawn method") used in this study was modified from the IRRI protocol (Hayashi *et al.* 2009). This method allowed the fungal isolates to produce a large number of mycelium in a shorter time. Fungal isolates preserved on desiccated filter papers

were revived on V-8 juice agar plate (each liter containing V-8 juice 100 mL, $CaCO_3$ 0.2 g, agar 17 g, pH 6.5) at room temperature. The 4-d-old colony was cut into pieces, transferred to a 125-mL flask containing 50 mL of prune broth (each liter containing prune 15 g, starch 2.5 g, yeast extract 0.5 g, pH 6.5). Fungal isolates were cultured in the prune broth on a shaker (130 rpm) at 28℃ for 4 d in the dark. Mycelial pellets and culture broth were homogenized in a sterile blender (Oster Blender 6640-022, Oster, Chicago, IL, USA) at low speed for 15 s to produce liquid spawn, from which 2-mL liquid spawn was dispersed evenly on a 9-cm diameter oat flour agar (OFA) plate (each liter containing oat flour 10 g, agar 17 g) and air dried to remove excess water in a laminar flow. The plates were placed in a zipper bag and incubated at 28℃ with a 12 h photoperiod fluorescent light for 4 d without sealing to induce sporulation. Conidia were harvested by flooding the plate with 10 mL of 0.025% Tween 80 solution and gently scrapping with a glass slide. The number of conidia was visually counted on the haemocytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) under a light microscope (100×). The yield of conidia produced by the liquid spawn method was compared with those produced by the IRRI protocol and the conventional agar plug method. Rice seedlings were inoculated according to Hayashi *et al*. (2009), to prove the pathogenicity of the conidia collected by these methods.

For each sporulation treatment, fungal isolate was inoculated on four OFA medium plates. Oat flour was prepared by grinding the whole oat groats (from local market) in a grinder in the laboratory.

Effect of sunlight and fluctuating temperature conditions on sporulation of *P. oryzae*

Effect of natural sunlight and fluorescent light with either fluctuation temperature or constant temperature on conidiation were evaluated and compared to identify the optimal conditions for sporulation in *P. oryzae*. The OFA medium plates inoculated with fungal isolates obtained from liquid spawn as described above were incubated in different combinations of light and temperature treatments. In the first experimental design, two treatments were fixed temperatures, the plates were incubated under a 12-h diurnal fluorescent light condition either 24℃ or 28℃, the other 2 treatments with fluctuated temperatures either 24−28℃ or 28−33℃. In the second experimental design, the plates were placed at room temperature (28−33℃) and exposed to 24-h constant fluorescent lights (LL), 24-h constant dark (DD), 12-h daily illumination (LD), or natural sunlight near the laboratory windows (SL). The laboratory was located in Wufeng District, Taichung City, Taiwan (24.029197N, 120.695850E), and the windows were facing south. On average, sunshine duration was 6.5 h per day in summer and 4.3 h per day in winter. After 4-d incubation, the number of conidia was determined using a haemocytometer. Each treatment has four replicates and the experiments were repeated twice.

Effect of the liquid spawn method on sporulation of different *P. oryzae* field isolates

In addition to YL2a3-1603, TJ4a3-1603 and PT5a5-1205 isolates, another 14 isolates collected in Taiwan fields failed to sporulate effectively using the agar plug method were evaluated for conidiation using the liquid spawn method. Conidiation by these fungal isolates were evaluated on OFA medium by the liquid spawn method as described above. The conidial yield of *P. oryzae* isolates cultured on agar plug method on PDA medium were used as the control. Each treatment contained 4 replicates, and the experiment was repeated twice. The number of conidia was determined using a haemocytometer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the R package, Agricolae (version 3.6.0) (De Mendiburu 2015) via analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least square difference

(LSD) test at $P < 0.05$ significance level. Data were expressed as mean ± standard deviation of at least four replicates.

RESULTS

Sporulation yields of the liquid spawn, IRRI protocol, and the agar plug method

To compare the effects of each factor in different sporulation methods, ANOVA was used to analyze the data (Table 1). Results indicated that isolate and method significantly impacted sporulation, and there was a significant interaction between isolates and methods ($P < 0.001$). Sporulation of all isolates was significantly ($P < 0.001$) affected by the methods used, in which the tested isolates tended to produce higher number of conidia when using the liquid spawn method than the agar plug method ($P < 0.001$) (Fig. 1). Using the liquid spawn method, isolate YL2a3-1603 produced 68.5×10^5 conidia plate^{-1} and TJ4a3-1603 40.3×10^5 conidia plate^{-1}, which were approximately 27-fold and 31-fold increases compared to the IRRI protocol. However, PT5a5-1205 isolate only increased 2-fold. Conidia of three isolates obtained by the liquid spawn method were used to inoculate rice seedlings of 'Tainan 11' cultivar. Results confirmed that the spores were still pathogenic and all could cause disease on the rice seedlings.

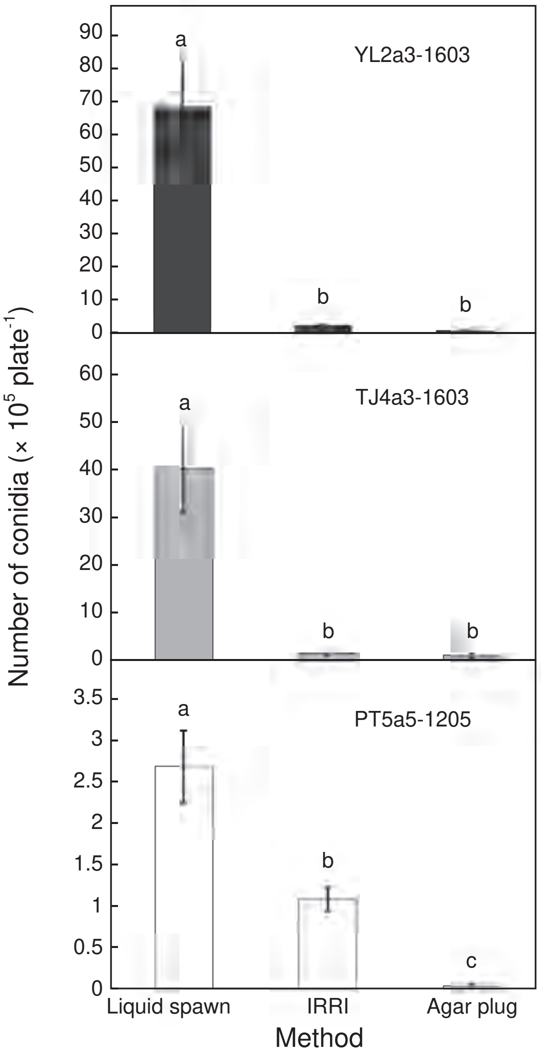

Fig. 1. The number of conidia of three *Pyricularia oryzae* isolates YL2a3-1603, TJ4a3-1603, and PT5a5-1205 using liquid spawn method, IRRI (International Rice Research Institute) protocol, and agar plug method on the oat flour medium. Error bar is the standard error of the mean ($N = 4$). Means with the same letter are not significantly different at 5% level by the least significant difference (LSD) test.

Table 1. The ANOVA result of the effects of different culture methods on the spore yields of 3 rice blast isolates[z].

Treatment	*df*	*MS*	*F*
Method	2	52051000000000	161.36***
Isolate	2	15359000000000	47.61***
Method × isolate	4	14123000000000	43.78***
Error	27	322580000000	

[z] ANOVA: analysis of variance; *df*: degree of freedom; *MS*: mean square. $N = 4$.
***Significant at 0.1% level.

Influence of sunlight and fluctuating room temperature condition on sporulation of *P. oryzae*

To further optimize culture conditions for sporulation, fungal isolates were grown under different combination of environmental factors and conidia were quantitatively compared. ANOVA was applied to analyze the data revealing that sporulation varied significantly among all isolates tested. Conidiation by *P. oryzae* was also impacted by light and temperature ($P < 0.001$) (Tables 2–3). There were significant interactions between isolates and light, as well as between isolates and temperature ($P < 0.001$). Temperature was set as the variable factor in the first experiment, revealing that the best temperature conditions for conidiation by isolates YL2a3-1603 and TJ4a3-1603 were at 28℃ and 24−28℃, respectively, under 12-h daily illumination. Fungi cultured in 28−33℃ produced the least conidia.

In the second experiment, fungal isolates were grown in 28−33℃ with different light sources and durations, revealing that *P. oryzae* isolates produced the most abundant conidia under natural sunlight. The results of experiments 1 and 2 showed that the combination of room temperature (28−33℃) and 12-h diurnal fluorescent light resulted poor sporulation of *P. oryzae*. However, at the room temperature condition, all 3 isolates showed higher conidial yield under the natural sunlight.

Effect of the liquid spawn method on sporulation of *P. oryzae* among different isolates

ANOVA was used to analyze the effects of different culturing methods on sporulation among different isolates (Table 4). Isolates and methods had significant effects on sporulation, and there was a significant interaction between isolates and methods ($P < 0.001$). Sporulation of all isolates was significantly ($P < 0.001$) affected by culturing methods. The conidial yield of 17 isolates inoculated with the liquid spawn method on OFA medium were all higher than those obtained by using agar plug PDA medium method ($P < 0.001$) (Table 5). As assessed using the agar plug method, BP2a2-1904 isolate produced the most abundant conidia, reaching 0.63×10^5 conidia plate^{-1}, but 9 out of 17 tested isolates of *P. oryzae* did not sporulate. In the liquid spawn method treatment, YL2a3-1603 isolate had the

Table 2. The ANOVA result of the effects of the temperature on the spore yield of 3 rice blast isolates under 12-h diurnal fluorescent light condition^z.

Treatment	*df*	*MS*	*F*
Isolate	2	70881000000000	133.99***
Temperature	3	4964500000000	9.38***
Temperature × isolate	6	3738100000000	7.07***
Error	36	529010000000	

^{z} ANOVA: analysis of variance; *df*: degree of freedom; *MS*: mean square. $N = 4$.
***Significant at 0.1% level.

Table 3. The ANOVA result of the effects of different light conditions on the spore yields of 3 rice blast isolates at the room temperature (28−33℃)^z.

Treatment	*df*	*MS*	*F*
Isolate	2	38323000000000	98.90***
Light	3	10012000000000	25.84***
Light × isolate	6	2619700000000	6.76***
Error	36	387520000000	

^{z} ANOVA: analysis of variance; *df*: degree of freedom; *MS*: mean square. $N = 4$.
***Significant at 0.1% level.

Table 4. The ANOVA result of the effects of different culture methods on the spore yields of 17 rice blast isolates[z].

Treatment	*df*	*MS*	*F*
Method	1	41118000000000	330.90***
Isolate	16	1135600000000	9.14***
Method × isolate	16	1110200000000	8.93***
Error	102	124260000000	

[z] ANOVA: analysis of variance; *df*: degree of freedom; *MS*: mean squares. $N = 4$.
***Significant at 0.1% level.

Table 5. The conidia spore yields of 17 rice blast isolates culturing in liquid spawn or agar plug methods.

	Number of conidia ($\times 10^5$ plate^{-1})	
Isolate	Liquid spawn	Agar plug
YL2a3-1603	29.4 ± 2.8 a[z]	0.04 ± 0.08 b
TJ4a3-1603	12.1 ± 1.4 a	0.08 ± 0.09 b
PT5a5-1205	7.9 ± 0.3 a	0.04 ± 0.08 b
BP2a2-1904	19.8 ± 4.2 a	0.63 ± 0.95 b
EM3a1-1904	1.4 ± 0.9 a	0 ± 0 b
XIH2a4-1904	7.6 ± 1.7 a	0.38 ± 0.48 b
SY3a3-1905	21.4 ± 17.5 a	0 ± 0 b
TL2a3-1905	16.6 ± 3.5 a	0.08 ± 0.09 b
XG2a2-1904	6.6 ± 0.5 a	0 ± 0 b
MS1a2-1903	13.5 ± 1.8 a	0 ± 0 b
DS1a1-1904	13.1 ± 7.3 a	0 ± 0 b
LIY2a2-1904	1.3 ± 0.3 a	0 ± 0 b
WD2a1-1904	2.4 ± 0.6 a	0 ± 0 b
Sx1a2-1905	9.5 ± 1.5 a	0.08 ± 0.09 b
XC1a(1)-1904	8.3 ± 1.3 a	0 ± 0 b
GS4a3-1905	11.1 ± 3.3 a	0.13 ± 0.25 b
TD1a3-1905	6.5 ± 0.4 a	0 ± 0 b

[z] Means with the same letter within each row are not significantly different at 0.1% level by the least significant difference (LSD) test.

highest conidial yield reaching 29.40 × 10^5 conidia plate^{-1}, and LIU2a2-1904 isolate was the lowest, which was 1.30 × 10^5 conidia plate^{-1}. Not only all tested isolates produced conidia using the liquid spawn method, some isolates increased at least 20-folds conidia production when compared to the agar plug method.

DISCUSSION

The liquid spawn method proposed by this study shortens the harvest time for *P. oryzae* conidia spores with less operation steps. The agar plug method requires 2 steps and at least 18 d to obtain conidia; 3 steps and 12 d were required using the liquid spawn method; while the IRRI protocol needs 4 steps and 25 d. The liquid spawn method was apparently the superior method to prepare conidia as this method produced abundant conidia in the shortest time period.

The conventional mycelium agar plug method takes about 2 wk for rice blast fungus to fully grown in a 9-cm diameter plate. The spore age obtained in this method varies greatly, in which the differences could maximum up to more than 10 d, and might indirectly affect the inoculation results. The IRRI protocol shortens the culturing time by dispersing the hyphae agar fragments with sterile water on the medium surface, so the rice blast fungi could quickly fully grow on the medium plates. This protocol can keep the spore age differences within 4 d, reducing the pathogenicity instability (Darby & Mandels 1955).

In our study, three isolates had poor conidial yield on agar plug medium, of which the highest sporulation was only 3.3 × 10^5 conidia plate^{-1} on PDA (Fig. 1). If such an isolate is necessary to be included in a study, huge amount of preparation works need to be done to ensure enough conidia yield for the following experiments. As such, the results obtained may not be able to objectively represent the real pathogenicity distribution of rice blast fungus populations in the field. The IRRI protocol can only slightly improve the conidial yield compared to the mycelium plug method. However, the IRRI protocol still has a risk of contamination during the process of scraping aerial hyphae and incubation

without lids. The liquid spawn method proposed in this study has solved the above-mentioned problems by homogenizing hyphae in a sterile blender instead of scrapping. The described method not only saves the intensive labor work, but also avoids the risk of medium dehydration and contamination of other microorganism. Based on the experiences of handling hundreds of rice blast fungi isolates, this method could greatly increase the sporulation of about 73% of the rice blast fungus field isolates in our laboratory, and thus shortens the time for the whole process. Although the increase in sporulation of some strains is still limited (Table 5), 9 isolates that could not sporulate using agar plug method were all able to produce spores using the liquid spawn method. We speculated that differences of the improving sporulation may be due to the differences in nutrient requirements or sporulation ability between strains. The other advantage of the liquid spawn method is relatively cheap by using the oat flour for the OFA medium. The oat flour is grounded with whole oat groats in the laboratory, which greatly reduce the cost of OFA medium to only USD $1 per liter.

In experiments with different temperatures and light conditions, the three tested isolates had the lowest sporulation under 12-h diurnal fluorescent light at room temperature (28−33℃) (Fig. 2). When the light treatment changed to the sunlight near the window, the sporulation of the three isolates increased significantly by 2.9−11.4 folds (Fig. 3). Previous studies have indicated that environmental factors have different effects on sporulation. Our data also support the notion that the combination of light and temperature is important for good conidia yield, and sunlight apparently is the key factor for *P. oryzae* sporulation. The results indicated that when *P. oryzae* is incubated under natural environment, most of isolates could sporulate. At present, light is the only known signaling factor that stimulates the conidiation of rice blast fungus (Deng *et al.* 2009). In contrast, the occurrence of asexual reproduction of *P. oryzae* is mainly stimulated by environmental light-to-dark transition rather than circadian clock (Lee *et al.* 2006). Abundant aerial hyphae and conidiophore development are observed in the dark period but not in the light period when cultured under the LD cycles, which demonstrated the aerial hyphae development in *P. oryzae* is suppressed by blue light (470 nm). *P. oryzae* has long been known to sporulate at the

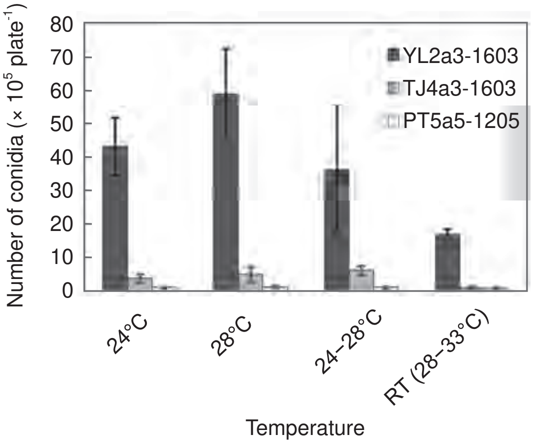

Fig. 2. The conidia yield of *Pyricularia oryzae* isolates YL2a3-1603, TJ4a3-1603, and PT5a5-1205 under 12-h diurnal fluorescent light condition at different temperatures, 24℃, 28℃, daily fluctuation ranging from 24–28℃, or 28–33℃ (room temperature; RT). Refer to Materials and Methods for details of experimental conditions. Error bar is the standard error of mean (*N* = 4).

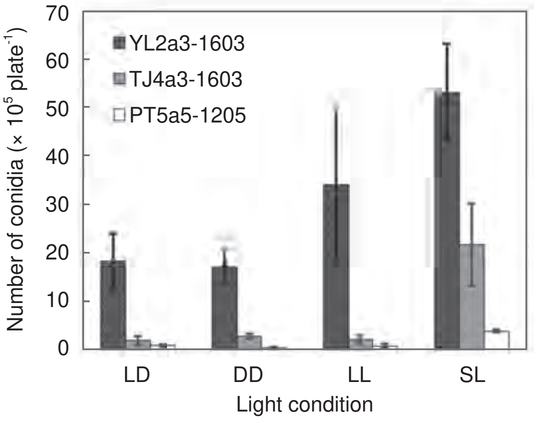

Fig. 3. The conidia yield of *Pyricularia oryzae* isolates YL2a3-1603, TJ4a3-1603, and PT5a5-1205 cultured at the room temperature (28−33℃) under different light conditions. LD: 12-h daily illumination; DD: 24-h constant dark; LL: 24-h constant fluorescent lights; and SL: natural sunlight near the laboratory windows. Refer to Materials and Methods for details of experimental conditions. Error bar is the standard error of mean (*N* = 4).

temperature range from 15℃ to 35℃, and the optimum temperature is 25−28℃ (Kuribayashi 1928). Under natural environment, there are no constant light, darkness, temperature, and humidity. Most studies often use constant or artificial control equipment (such as fluorescent lamps). Thus, the data obtained may not be able to reflect the true behavior of the organism in natural environment. Whether or not different wavelength compositions and other factors exist in the sunlight that affect the sporulation of *P. oryzae* isolates remains to be determined. If the asexual generation of rice blast fungus is actually affected by environmental light and temperature changes rather than the circadian clock, finding the genetic factors affected by light and temperature might help solve the conidia production problem of *P. oryzae*.

In nature, after rice blast fungus successfully penetrates rice tissue, 5−7 d later, conidiophores developed to bear conidia, which are released on the surface of the lesions in the night environment when temperature drops and humidity increases. The improved liquid spawn method as described in this study simulates the growth and sporulation ecology of *P. oryzae* in fields. The medium plate without sealing and incubating under room temperature and sunlight is to create a culture condition similar to the natural environment in the field to induce sporulation of *P. oryzae*.

The combination of injured mycelial fragments as the inoculation source, culturing *P. oryzae* on low-nutrient source (oat flour), and keeping in the natural ventilation petri dishes were to avoid the fungus undergo excessively vegetative growth. These treatments allow most of the *P. oryzae* isolates start to produce a large quantity of conidia within 24 h after inoculation into the OFA medium. However, differences in the sporulation ability and nutrient requirement were observed among some isolates. Thus, the medium formula must be adjusted to effectively increase the sporulation for certain isolates with specific nutrient requirements (Ou 1985).

The production of a good quantity of quality inoculum is crucial for studying many aspects of fungal species (Rodrigues *et al*. 2010). The combination of many factors, such as light, temperature and nutrition, seems to affect the sporulate behavior of *P. oryzae*. The liquid spawn method overcomes the problems of slow growth and unstable conidia production of *P. oryzae*. Further research needs to be done to clarify the effect of light wavelength on *P. oryzae* sporulation.

REFERENCES

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4th ed. Academic Press. San Diego, CA. 635 pp.

Chakrabarti, N. K. and R. D. Wilcoxson. 1970. Effects of light on sporulation by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 60:171–172. doi:10.1094/Phyto-60-171

Chaudhary, B., S. Kumar, R. L. Sharma, and S. R. Jakhar. 2018. Effect of different media, pH and temperature on growth and sporulation of *Fusarium udum* causing wilt of pigeonpea. Intl. J. Curr. Microbiol. App. Sci. Spec. Issue 6:2005–2011.

Chen, Y. N., C. W. Chen, and T. C. Lin. 2013. Studies on physiological races of *Magnaporthe oryzae*, causal agent of rice blast, in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 62:40–56. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.2013.06201.05

Darby, R. T. and G. R. Mandels. 1955. Effects of sporulation medium and age on fungus spore physiology. Plant Physiol. 30:360–366. doi:10.1104/pp.30.4.360

De Mendiburu, F. 2015. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.2-3. https://CRAN.R-project.org/package=agricolae (visit on 03/18/2019)

Deng, Y. Z., M. Ramos-Pamplona, and N. I. Naqvi. 2009. Autophagy-assisted glycogen catabolism regulates asexual differentiation in *Magnaporthe oryzae*. Autophagy 5:33–43. doi:10.4161/auto.5.1.7175

Hajano, J. U. D., M. A. Pathan, Q. A. Rajput, and M. A. Lodhi. 2011. Rice blast-mycoflora, symptomatology and pathogenicity. IJAVMS 5:53–63.

Hajano, J. U. D., A. M. Lodhi, M. A. Khanzada, M. A. Rajput, and G. S. Shah. 2013. Influence of abiotic factors on the vegetative growth and sporulation of *Magnaporthe oryzae* Couch. Pakistan J. Phytopathol. 25:65–70.

Hau, F. C. and M. C. Rush. 1980. A system for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*. Plant Dis. 64:788–

789.

Hayashi, N., N. Kobayashi, C. M. Vera Cruz, and Y. Fukuta. 2009. Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease in rice. p.17–33. *in*: JIRCAS Working Report. No. 63. (Fukuta, Y., C. M. Vera Cruz, and N. Kobayashi, eds.) Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Tsukuba, Japan. 124 pp.

Hemmi, T. and J. Imura. 1939. On the relation of air humidity to conidial formation in the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, and the characteristics in the germination of conidia produced by the strains showing different pathogenicity. Japan. J. Phytopathol. 9:147–156. (in Japanese with English abstract) doi:10.3186/jjphytopath.9.147

Koga, H., K. Dohi, R. Yoshimoto, and M. Mori. 2008. Resistance in leaf blades assessed by counting conidia correlates with whole-plant-specific resistance in leaf sheaths in a compatible rice- *Magnaporthe oryzae* interaction. J. Gen. Plant Pathol. 74:246–249. doi:10.1007/s10327-008-0091-7

Kuribayashi, K. 1928. Studies on overwintering, primary infection and control of rice blast fungus, *Piricularia oryzae*. Japan. J. Phytopathol. 2:99–117. (in Japanese with English abstract) doi:10.3186/jjphytopath.2.99

Lan, B., X. Li, Y. Yang, L. He, and F. Meng. 2012. Study on sporulation technology of *Magnaporthe grisea*. Acta Agric. Jiangxi 24:74–76. (in Chinese with English abstract)

Lee, K., P. Singh, W. C. Chung, J. Ash, T. S. Kim, L. Hang, and S. Park. 2006. Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genet. Biol. 43:694–706. doi:10.1016/j.fgb.2006.04.005

Namai, T., S. Yamanaka, and T. Misawa. 1977. Studies on the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. II. Effect of irradiation at different stages of sporulation. Japan. J. Phytopathol. 43:175–182. (in Japanese with English abstract) doi:10.3186/jjphytopath.43.175

Namai, T. and S. Yamanaka. 1985. Studies on the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. IV. Effect of hyphal age and culture media on sporulation. Tohoku J. Agric. Res. 35:69–79.

Netam, R. S., A. N. Bahadur, R. K. S. Tiwari, and U. Tiwari. 2013. Effect of different culture media, carbon source, nitrogen source, temperature and pH, Level on the growth and sporulation of *Pyricularia grisea* isolate from finger millet. Res. J. Agric. Sci. 4:83–86.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. 380 pp.

Rajput, L. S., T. Sharma, P. Madhusudhan, and P. Sinha. 2017. Effect of temperature on growth and sporulation of rice leaf blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. Intl. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 6:394–401. doi:10.20546/ijcmas.2017.603.045

Rodrigues, T. T. M. S., L. A. Maffia, O. D. Dhingra, and E. S. G. Mizubuti. 2010. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. Trop. Plant Pathol. 35:203–212. doi:10.1590/S1982-56762010000400001

Skamnioti, P. and S. J. Gurr. 2009. Against the grain: Safeguarding rice from rice blast disease. Trends Biotechnol. 27:141–150. doi:10.1016/j.tibtech.2008.12.002

Talbot, N. J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Microbiol. 57:177–202. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090957

簡易經濟的稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*) 產孢誘導方法

陳繹年 [1] 吳東鴻 [2] 陳美君 [3] 陳珮臻 [4,*]

摘要

陳繹年、吳東鴻、陳美君、陳珮臻。2021。簡易經濟的稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*) 產孢誘導方法。台灣農業研究 70(1):1–10。

稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*) 的生理小種鑑定與水稻品種的抗性評估，都需要大量病原孢子作為接種源進行接種檢定。為獲得穩定的檢定結果，接種源分生孢子的齡期必須具一致性。本研究改良國際稻米研究所常用的稻熱病菌產孢誘導程序 [IRRI (International Rice Research Institute) protocol]，利用菌絲體均質方式 (稱「液態菌種法」) 來誘導稻熱病菌在短時間內同時大量產孢。操作程序為：(1) 將 4 日齡的稻熱病菌落以滅菌解剖刀切細碎後，移入加州梅養液中震盪培養 4 d；(2) 以滅菌均質瓶將菌絲體與養液一起均質作為液態菌種，取適量液態菌種接種於燕麥粉平板培養基 (oat flour agar; OFA) 上，於無菌操作台中風乾培養基表面多餘水分後，置於室溫、窗邊自然光環境下培養 4 d 進行產孢誘導。供試菌株採用液態菌種法後的分生孢子產量，明顯高於採用 IRRI protocol 的孢子產量 (2–31倍)。另外，14 株於傳統菌絲塊培養法下產孢不良的稻熱病菌株，在採用液態菌種法培養後，所有菌株的產孢量都有顯著提昇。本研究結果顯示，液態菌種法可用於誘導稻熱病菌同時大量產孢。

關鍵詞：稻熱病、產孢、分生孢子、液態菌種、燕麥粉培養基。

投稿日期：2020 年 9 月 30 日；接受日期：2020 年 12 月 25 日。

[*] 通訊作者：janetchen@nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 國立中興大學植物病理學系副教授。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):11–23 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0002

研究報告

植物表型體分析平台於蔬菜自動外表型分析之應用

林思妤[1] 杜元凱[1] 游舜期[1] 傅月英[2] 林大鈞[3,*]

摘要

林思妤、杜元凱、游舜期、傅月英、林大鈞。2021。植物表型體分析平台於蔬菜自動外表型分析之應用。台灣農業研究 70(1):11–23。

隨著基因組定序技術的蓬勃發展，作物育種在基因體分析上已步入高通量、大數據的階段。然而，相對應的外表型分析技術卻尚未跟上基因型分析技術的腳步，成為作物育種發展的瓶頸。所以，高通量自動化植物外表型分析平台的建立，已是作物育種的重要課題。本研究使用自動化三維雷射掃描器進行植物外表型資料的收集及分析，首先針對大豆、小油菜及甜瓜進行掃描參數驗證。結果顯示，傳統手動量測與機器自動掃描所得到的數據，在株高、葉面積及生物量上皆具高度相關性 ($r > 0.85^{***}$)。接著，將三維雷射掃描器應用於 2 個蔬菜栽培研究試驗中，分別為不同土壤微生物製劑對胡瓜生長之影響試驗，以及不同氮含量配方對番茄生長之影響試驗。結果顯示，三維雷射掃描器可達到省工並連續收集外表型資料，有助於判定植株生長差異以及差異出現之時間點。試驗證實，自動化植物表型體設施具有快速、高通量、客觀及非侵入式之優點，將有助於作物育種發展。

關鍵詞：表型體、高通量、三維雷射掃描、作物。

前言

作物育種的核心概念為「植物外表型 (phenotype; P) 受到基因型 (genotype; G)、環境 (environment; E) 及此二者間的動態交互作用 (G × E) 所影響」。隨著次世代定序技術發展完善及成本的降低，大量基因型數據的取得變得容易，使得基因型分析進入大數據時代，且加速了數量性狀基因座定位 (quantitative trait locus mapping) 的效率，並使全基因體關聯性研究 (genome-wide association study; GWAS) 變得容易可行 (Natarajan *et al*. 2016; Xiao *et al*. 2017; Jaganathan *et al*. 2020)。作物的表現 (外表型) 是育種所追求的終極目標，任何育種相關基因型研究或環境研究，皆須對應外表型才具有意義。然而，在基因型分析進入大數據時代的同時，外表型資料仍無法客觀、高通量且普及性地取得資料，成為基因探勘或作物育種選拔常遭遇的瓶頸之一。傳統外表型數據的取得耗費時間及人力，且結果易受人為主觀的干擾，有時甚至必須破壞植株方能取得資料 (Chen *et al*. 2014)。鑒於上述原因，建立自動化、非破壞性且高通量的植物外表型分析系統，已成為目前育種亟需發展的課題。

目前世界各國的學研單位、私人企業及國際組織紛紛發展各自的自動化表型體分析設施，例如：澳洲植物表型機構 (Australian Plant Phenomics Facility; APPF)、英國國家植物表型體分析中心 (National Plant Phenomics Center)、法國蒙佩利爾植物外表型分析平台 (Montpellier Plant Phenotyping Platform)、印度 Nanaji Deshmukh 植物表型體中心 (Nanaji Deshmukh Plant Phenomics Centre) 及國際半乾旱熱帶作物研究中心 (International Crops Research Institute

投稿日期：2020 年 8 月 18 日；接受日期：2020 年 10 月 26 日。
[*] 通訊作者：dagin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

for the Semi-Arid Tropics) 等，以精確且大量地取得植物生長即時外表型數據，進一步釐清重要性狀基因或是加速育種選拔。現今自動化植物表型體分析平台可依照掃描器與植物間移動模式，分為兩大類：一為「植物至感測器」(plant-to-sensor)；另一為「感測器到植物」(sensor-to-plant)。前者為植物經由輸送帶進入一配備各式感測器 (sensor) 之箱子，並在箱子中擷取植物影像。此系統之優點為可將外界干擾因子降到最低，並調整影像擷取環境為最適化狀態，以獲取最佳影像結果。後者則為感測器移動、植物不動的形式，適合進行易受移動干擾的性狀調查，如植物冠層或特定環境條件之研究 (Yang *et al*. 2020)。

在影像收集方面，多種感測器及其影像擷取技術，已漸趨成熟並可應用於農業研究。RGB 分析影像技術 (red-green-blue imagery) 又稱為可見光影像分析技術，由於價格低且容易取得之優點，常用於植物生物量、外觀特性或生長趨勢分析 (Yang *et al*. 2014; Knoch *et al*. 2020)，但缺點為無法有效呈現植株內部生理資訊。高光譜影像 (hyperspectral imaging) 分析技術提供植物影像大量、大範圍的波長資訊，常用於早期發現或量化病蟲害逆境、非生物逆境下的植物反應 (Rumpf *et al*. 2010; Römer *et al*. 2012; Yuan *et al*. 2014; Thomas *et al*. 2018)，惟其價錢高昂且資料分析較繁複。熱影像 (thermal imaging) 分析技術可偵測植物表面溫度變化，其變化會受氣孔導度、蒸散作用等生理或背景環境影響。當植物遭受逆境時，氣孔導度、蒸散作用可能會直接或間接受到影響，所以熱影像分析技術常被應用於探討作物逆境反應的相關研究，尤其與水分密切相關之逆境，如乾旱、淹水、鹽分逆境 (Prashar & Jones 2014; Khorsandi *et al*. 2018; Vaughan *et al*. 2018)。螢光影像 (fluorescent imaging) 分析技術可於黑暗環境中偵測葉綠素和次級代謝物等特定生理訊息，常用於光合作用及植物結構的相關研究 (Tian *et al*. 2004; Rousseau *et al*. 2013; Perez-Sanz *et al*. 2017)。在立體成像分析技術方面，植物的三維影像常由多個影像拼接模擬 (Fang *et al*. 2016)，或由雷射影像技術所建構 (Paulus *et al*. 2014)，相較於傳統的二維影像，可獲得三維立體結構資料或是更多特定部位之性狀資訊。

行政院農業委員會農業試驗所 (以下簡稱農試所) 長期進行作物育種、栽培、種原繁殖及保存等相關研究，每年需要大量人力進行作物外表型調查，且可能面臨調查紀錄受人為主觀影響之情形。因此，為提升外表型調查之效率及數據客觀性，並降低大量人力需求，農試所於 2017 年開始建置自動化植物表型體設施，包含實驗室、溫室及露地等不同規模之表型體系統，期盼透過此套設施之建置，輔助各項研究進入大數據世代，並節約人力成本。本文使用之自動化表型體系統建置於農試所生物技術組精密溫室，含 3 軸 (X、Y 及 Z 軸) 自動化大型天車系統，搭載 Phenospex 公司 (Heerlen, The Netherlands) PlantEye 三維雷射掃描器及 HortControl version 3.3 分析系統，為國內目前首座表型體分析溫室。

Phenospex 公司的 PlantEye 三維雷射掃描器，是一種具有高解析度的雷射掃描器，屬於前述「感測器到植物」的表型體分析系統。目前已被應用在多種作物上，如油菜、花生、豇豆、小麥、水稻及珍珠粟 (Kjaer & Ottosen 2015; Vadez *et al*. 2015)。但目前已發表系統均建置於 2 軸 (X 軸、Y 軸) 自動化天車系統，本文所用系統為世界首座建置於 3 軸自動化天車系統的表型體分析設施。同時，目前多數表型體設施相關試驗分析標準流程，多為國際私人種子公司所發展，資料取得相當不易。爰此，為評估農試所建立的表型體溫室設施及分析方法的實際應用性，本篇研究先探討此自動化植物表型分析系統與傳統外表型分析方法數據間的相關性，以評估系統取代傳統外表性狀分析方法的可行性。本文研究先利用不同植株大小、生長形式之蔬菜作物為對象，進行自動化與傳統人工量測數據之比較。同時，將系統直接應用在分析胡瓜 (*Cucumis sativus*) 及番茄 (*Solanum lycopersicum*) 作物，分別於不同土壤益生菌製劑及氮含量處理下的表型體分析，以評估該自動化表型體設施的實際應用性。

材料與方法

植物材料

本試驗在第一部分，探討自動化植物表型分析系統與傳統外表型分析方法數據間的相關性，使用的植物材料包含大豆 (*Glycin max*) 品種 'CRWD'、甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 品種「嘉玉」及小油菜 (*Brassica rapa*) 品種「農興 80 天」，三種作物皆於穴盤中以泥炭土 (Jiffy substrates, Johannesburg, South Africa) 進行育苗，於 2019 年 6 月 3 日分別將 2–3 葉齡大豆及甜瓜幼苗定植於盛裝田土的 6 吋盆栽及盛裝泥炭土的 8 吋盆栽；小油菜則於本葉剛冒出時 (同年9月5日) 定植於盛裝泥炭土的3吋盆栽中，並移入具風扇、水牆的玻璃溫室中 (台中霧峰農試所生技園區)，其溫度控制於 25–35℃，而光子流密度最高約可達 800 μmol m^{-2} s^{-1}。肥培管理則依照慣行栽培法施行。大豆於定植後第 2–7 週每週取 3 株；甜瓜於定植後 2–4 wk 每週取 4 株；小油菜分別於定植後 7、12、15、18及27 d取4株進行手動量測與自動掃描。

在本試驗第二部分，自動化植物表型分析系統應用於蔬菜外表型分析，分別使用胡瓜及番茄為植物材料。胡瓜為市售胡瓜苗 ('CU-87')，於 2019 年 11 月定植於裝有前述泥炭土之 6 吋盆中，栽培管理依照慣行栽培法施行。番茄使用品種為「玉女」，以泥炭土進行育苗，於 3 葉齡時定植於盛裝 150 g 珍珠石之 5 吋黑色軟盆中，定植當天移入移入具風扇、水牆的玻璃溫室。

試驗處理

微生物製劑處理

4款未商品化土壤微生物製劑製品 (A、B、C、D) 分別依推薦稀釋倍數進行稀釋，在定植後澆灌於胡瓜盆栽中，往後每週澆灌一次，對照組則以水替代。試驗採完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，每處理 8 重複。

氮肥處理

氮肥濃度為參考 Mao *et al*. (2014) 養液組成，將其養液設為對照組 (100% 氮處理)，並將養液中氮濃度分別調整為 0、50 及 200%，進行不同氮肥濃度處理，每週澆灌 5 次。試驗採 CRD，每處理 6 重複。

自動化植物表型體分析方法

本試驗使用三維雷射掃描器 (PlantEye F500, Phenospex, Heerlen, The Netherlands) 進行自動化植物量測，其架設於天車 (移動軸) 上，屬「感測器至植物」的自動化表型體系統。天車可依待測植物高度及數量進行 X、Y、Z 三方向移動，X 軸長 4.5 m，Y 軸長 10.2 m，Z 軸高 1.8 m (圖 1)。自動化植物表型體系統設置於本所玻璃溫室內，該溫室配有風扇、水牆控溫，溫度控制於 25–35℃，最高光子流密度約 800 μmol m^{-2} s^{-1}。天車下方以盆栽形式擺放植物，預設以 400 mm × 400 mm 之正方形為 1 單位 (unit)，1 直排含 24 個單位，共 11 直排。

本試驗所使用三維雷射掃描器可投射 4 種波長雷射光於待測植物上，包含紅 (624–634 nm)、綠 (530–555 nm)、藍 (465–485 nm) 及近紅外光 (720–750 nm)，並以 complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) 影像感測器偵測反射光，進而形成三維點雲並自動演算葉面積、葉面曲度、株高、投影葉面積、葉面積指數、光投影深度、數位體積、標準化植被指數 (normalized difference vegetation index; NDVI)、綠度 (greeness)、標準化葉綠素比率指數 (normalized pigments chlorophyll ratio index; NPCI)、植物老化反射指數 (plant senescence reflectance index; PSRI) 及色相 (hue) 等參數。

各項指數之計算方式如下：株高為扣除最高 2% 的點後與盆高之差異，葉面積為掃描點網格化 (mesh) 後的所有網格面積總和，生物量則為總表面積與植物高度之乘積。綠度為 (2 × GREEN – RED – BLUE)/(RED + GREEN + BLUE)，NDVI 為 (NIR – RED)/(NIR + RED)，NPCI 為 (RED – BLUE)/(RED + BLUE)，PSRI 則是 (RED – GREEN)/(NIR)。其成像解析度可達 1 mm，但掃描器距待測植物越遠，解析度下降。

本試驗將各待測植物以盆栽形式放置於天車下方，每日 11–13 時之間進行一次掃描。天車以 30 mm s^{-1} 速度進行掃描，搭載之三維雷

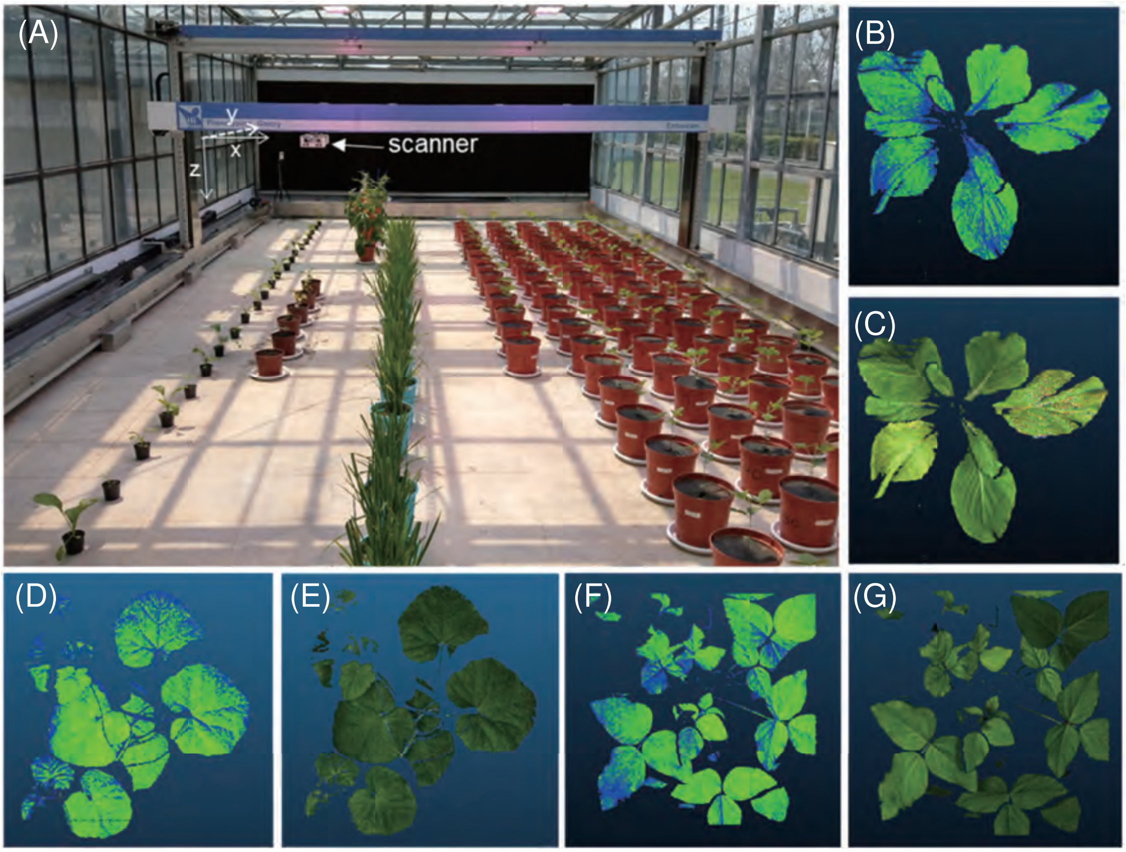

圖 1. (A) 自動化植物表型掃描系統，(C、E、G) 植株彩色 3D 影像及 (B、D、F) 3D 點圖影像；其中，(B)、(C) 為小油菜，(D)、(E) 為甜瓜，(F)、(G) 為大豆。

Fig. 1. (A) Auto-phenotyping system, (C, E, G) 3D color images and (B, D, F) point cloud images of (B, C) rapeseed, (D, E) melon, and (F, G) soybean.

射掃描器隨植物高度調整 Z 軸高度，保持距離植株約 400–500 mm。

傳統外表型量測方法

株高以尺量測植株最高處與盆高之差異，葉面積是將植株每片葉以掃描器 (Epson perfection V37) 掃描並以 Image J 軟體計算葉面積，生物量則以磅秤量測地上部重量。

數據統計分析

本試驗所有統計皆於 R 語言 (version 3.6.2) 及 RStudio (version 1.2.5033) 環境下進行計算，其中相關係數 (correlation coefficient) 及變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 是以 STATS 套件進行分析，散布圖 (scatterplot) 是以 Graphics 套件繪圖，而多重比較法是採 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significance test; LSD test)，以 Agricolae 套件分析。植物 3D 圖是以 CloudCompare (version 2.11 alpha) 讀檔及呈現。

結果與討論

自動化表型體分析與傳統外表型分析間之相關性分析

為驗證三維雷射掃描器得到之生長參數是否與傳統人工量測具相關性，本文針對不同科別及植株型態進行測試，包含葉片互生大小約 10 cm 之大豆 (豆科)、約 20 cm 且快速向上生

長之甜瓜 (葫蘆科) 及葉片輪生且株高矮 (< 20 cm) 之小油菜 (十字花科)。試驗結果顯示，在大豆部分 (表 1 及圖 2)，定植後 2–7 wk 不論在株高、葉面積及生物量等參數，其手動量測與自動掃描結果的相關係數 (r) 皆 > 0.70。其中在第 2–3 週 r 介於 0.70–0.93；第 4–6 週 r 則提升至 0.80–0.96，且為極顯著相關 (P < 0.001)；第 7 週 r 較第 6 週下降，為 0.72–0.86。此結果推測可能是因為大豆在不同定植週數的型態變化有關。大豆為羽狀三出複葉，初期僅主蔓向上生長，葉片對生，上方葉可能遮蔽下方葉造成葉面積量測誤差；而在株高部分，最上方未展開新葉與下方已展開複葉距離較遠 (節間長)，而三維雷射掃描器會扣除最高 2% 的點，因而造成定植後 2–3 wk 相關性不高。由此可見，大豆初期因為葉片數量少，些許外觀的變動 (如小部分遮蔽、新芽小等) 即易造成手動量測與自動掃描結果間的 r 降低。在定植後 4–6 wk 後，側芽開始生長，葉片數大幅增加，此時葉片間遮蔽不足以影響兩種檢定方法間的 r，因此 r 皆達 0.80 以上，且具有極顯著的相關性。定植後 7 wk 後，兩檢定方法在葉面積及生物量上的 r 降低，一方面可能肇因於葉片過於茂密，導致較多的遮蔽所造成；另一方面，則可能是大豆植株側向生長超過三維雷射掃描器被定義的量測方格。

在甜瓜部分，定植後 2–4 wk 後，手動量測與自動掃描之 r 皆達 0.85 (P < 0.001)，其中在株高方面 r 達 0.95 以上，葉面積之 r 則隨週數增加而逐漸下降 (r = 0.99、0.89、0.85)。甜瓜葉的生長型態為單葉互生，葉大且平展，因此自生育初期手動量測與自動掃描即具高度相關性。尤其在株高方面，因新葉與最上方展開葉相近，展開葉面積大且平行地面，因此掃描器即易辨認最上方資料點，造成手動量測與自動掃描間即高之相關性。在甜瓜葉面積方面，手動量測與自動掃描結果間的 r 隨週數增加而逐漸下降，推測可能肇因於甜瓜單葉的面積較大，遮蔽下方葉片所致。本次試驗中，甜瓜自定植第 4 週起，其橫向生長逐漸超出 3D 雷射掃描器之定義量測範圍，故供試甜瓜品種適用之量測期為定植後 4 週內，但隨供試品種不同 (葉

表 1. 不同苗齡 (A) 大豆、(B) 甜瓜及 (C) 小油菜自動掃描與傳統量測之相關係數 (r)。

Table 1. The correlation coefficient (r) of destructive measurement and scanner measurement of plant height, leaf area, and biomass in different ages of (A) soybean, (B) melon and (C) rapeseed.

	(A) Soybean						(B) Melon			(C) Rapeseed				
Weeks after planting	2	3	4	5	6	7	2	3	4	7	12	15	18	27
Plant height	0.77	0.70^{*}	0.84^{***}	0.83^{***}	0.87^{***}	0.86^{***}	0.99^{***}	0.99^{***}	0.95^{***}	0.50	0.91^{***}	0.87^{***}	0.84^{***}	0.86^{***}
Leaf area	0.83^{*}	0.75^{*}	0.80^{**}	0.90^{***}	0.90^{***}	0.72^{***}	0.99^{***}	0.89^{***}	0.85^{***}	0.66	0.97^{***}	0.93^{***}	0.97^{***}	0.91^{***}
Digital biomass	0.93^{**}	0.72^{*}	0.96^{***}	0.87^{***}	0.90^{***}	0.77^{***}	0.99^{***}	0.99^{***}	0.88^{***}	0.62	0.89^{***}	0.88^{***}	0.89^{***}	0.93^{***}

*, **, *** represent P < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

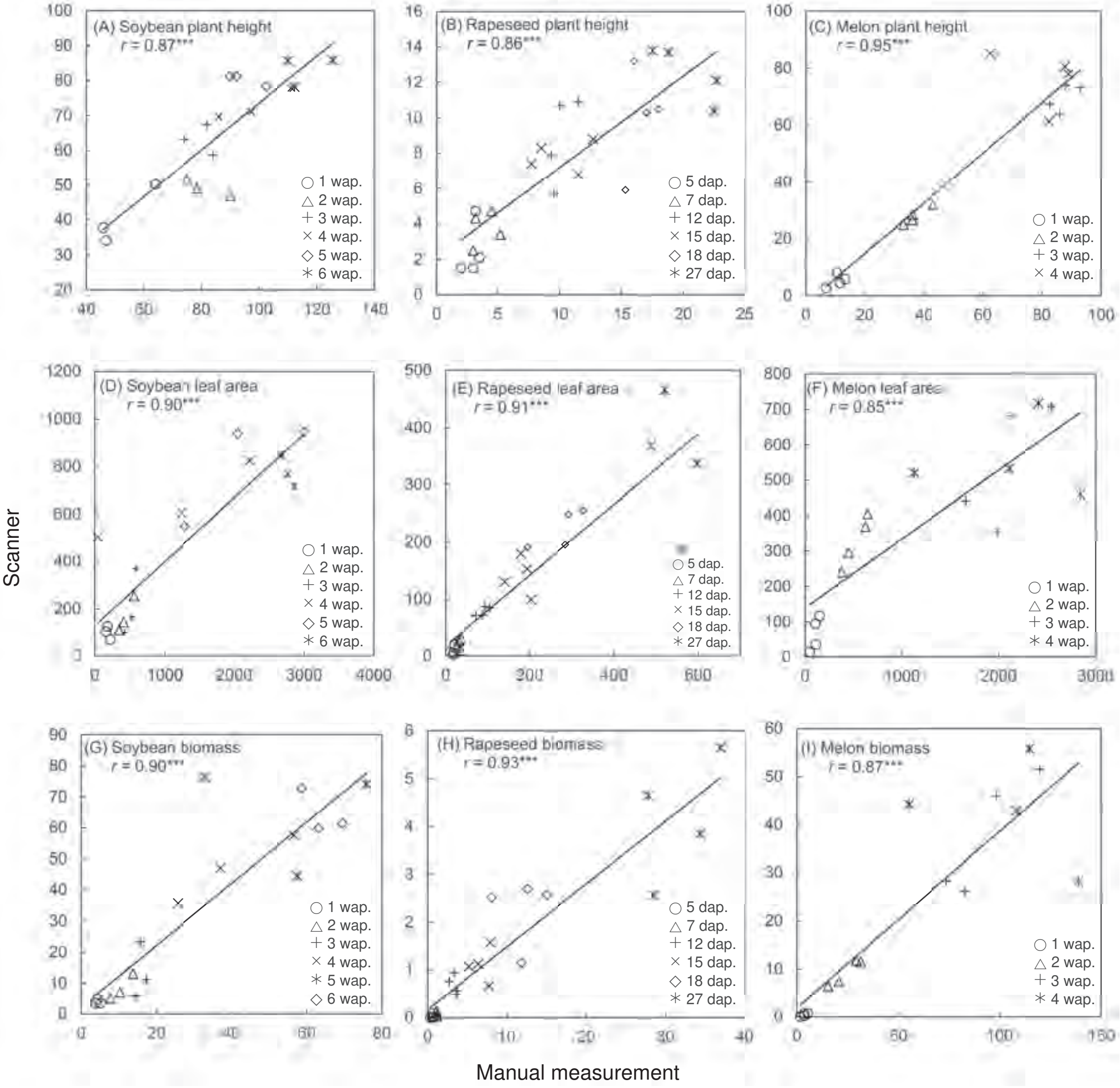

圖 2.　不同作物傳統手動量測與儀器自動掃描之相關性。直行表示不同作物，由左至右分別為大豆、小油菜及甜瓜；橫列表示不同參數，由上至下分別為株高、葉面積及生物量。不同形狀的標點表示定植後不同天數 (days after planting; DAP) 或週數 (weeks after planting; WAP) 收集之資料。左上角標示相關係數 (*r*)，顯著差異性以星號表示 ($^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$)。

Fig. 2.　Correlation between destructive measurement and scanner measurement of plant height, leaf area and biomass in soybean, rapeseed and melon. Different dot types represent the data collected in differential developmental stages. Values of correlation coefficients (*r*) are shown on the top left of each plot and stars represent the significance of the correlation coefficient ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$).

大小、生長勢不同)、栽培管理方式不同等，亦會影響可用三維雷射掃描器進行量測之作物生長期。

在小油菜相關研究部分，其於定植後 7 d，手動量測與自動掃描間結果的 *r* 皆低於 0.70，但定植後 12–27 d，不論在株高、葉面積及生物量方面，兩檢定方法結果的 *r* 皆大於 0.86 ($P < 0.001$)。進一步觀察小油菜生長型態及不同定植週數之手動量測與自動掃描間 *r*，發現由於小油菜為小型作物 (生長橫徑、高度 < 30

cm)，葉輪生，定植初期其橫徑及株高僅約 2–5 cm，自動掃描極易受土壤高度、地面平整性、植株傾斜等因子而干擾掃描的結果。因此，小油菜初期之 *r* 較低。但定植後 12–27 d，由於葉輪生導致上位葉不易遮蔽下位葉，且葉片大多平行地面，因此在葉面積及株高部分，手動量測與自動掃描之相關係數皆具高度相關性。定植 27 d 以後，植株開始抽苔並開花，抽苔高度大於 60 cm，導致雷射掃描器因對焦範圍的限制，造成下方葉成像的解析度驟降外，花器亦可能遮蔽下方葉片，使得掃描器量測數據不穩定。由此結果可知，此類輪生之小型作物，僅在抽苔前適合以三維雷射掃描器進行自動化外表資料收集。

綜觀上述三個作物，包含葉小而多之中型植物 (大豆)、葉大而平且快速生長之中型植物 (甜瓜) 及葉輪生之小型植物 (小油菜)，它們在多數生長階段的手動量測與自動掃描結果 *r* 皆高於 0.70，生長中期 *r* 更大於 0.80。顯示三維雷射掃描器確實可替代手動量測，用於進行植株外表型數據之收集。惟須注意植株大小是否超出三維雷射掃描器的對焦範圍，同時植株橫向生長不可超出掃描器定義掃描範圍外 (預設為 400 mm × 400 mm 之正方形)。除此之外，亦須注意三維雷射掃描器可能受到環境光線干擾，如水盤、銀黑布及非深色介質等反光，栽培時須盡量去除週邊反光甚至是光線不均勻之處。總而言之，使用三維雷射掃描器進行外表資料收集，只要隨供試植物外觀、生長特性、生長時期調整三維雷射掃描器之高度及掃描範圍，即可用於取代傳統人力調查，除節省大量人力外，亦可快速得到大量、客觀且連續性之資料，將可解決作物育種及種原調查上高通量外表型資料的需求。

自動化植物表型體設施應用於蔬菜栽培研究

雷射三維掃描器，在植物外表型分析上已有廣泛且深入的研究 (Paulus *et al*. 2014; Maphosa *et al*. 2017)。本試驗所用 Phenospex 公司的 PlantEye 三維雷射掃描器更是植物表型體分析慣用的掃描器，番茄表型分析的範例，已公布於其官網 (https://phenospex.com/products/plant-phenotyping/planteye-f500-multispectral-3d-laser-scanner)，而胡瓜的相關應用範例多為種苗公司的分析結果，卻因營業秘密而未被公開。另一方面，植生指數 (vegetative indices; VI) 亦已被廣泛應用在廣泛作物的外表型分析 (Hatfield & Prueger 2010; Hatfield *et al*. 2019; Kokhan & Vostokov 2020)。為了進一步探討本所自動化植物表型體分析平台，是否能偵測出不同栽培處理下，胡瓜及番茄等蔬菜作物生長的外表型差異差異，本試驗以自動化植物表型體設施，每日進行植物各種生物量及 VI 參數的收集。以下以兩個試驗為例。

不同土壤微生物製劑對胡瓜生長之影響

本試驗以三維雷射掃描器記錄胡瓜在施用 4 款不同土讓微生物製劑下的各項植物參數，試驗結果顯示 (圖 3–4)，胡瓜株高在定植後 5 d 內，各種微生物製劑的處理，對胡瓜的生長無顯著差異；但定植 7 d 後，各製劑處理間，開始明顯對胡瓜生長有影響；而定植 10 d 後，對胡瓜的生長影響更為顯著。在葉面積方面，定植後 3 d 時，仍無顯著影響，但定植後 5–7 d，各處理對葉面積的影響即有顯著之差異；定植後 10 d，各處理對葉面積的影響卻又沒有顯著之差異，其可能肇因於這階段各處理的胡瓜植株橫向生長皆超過儀器定義掃瞄範圍外，以及上位葉片太大遮蔽下方葉片所致。在生理指標方面，綠度、NDVI、PSRI 及 NPCI 處理間並無顯著差異。透過三維雷射掃描器得到的數據，顯示供試 4 款土壤微生物製劑商品對胡瓜之生長皆有促進作用，其中又以 B 微生物製劑商品之效果最佳。此結果顯示，自動化植物表型體設施，可用於快速且客觀評估微生物製劑的商業功能或價值，又透過每日收集外表型資料，可追查差異性變化出現之時期。例如，此試驗過程可發現定植 5 d 時，不同處理導致胡瓜生長葉面積出現差異；定植 7 d 後，不同處理導致胡瓜生長株高出現差異。

不同氮含量處理對蕃茄生長之影響

同樣地，將三維雷射掃描器應用於收集不同氮含量處理下番茄生長的各項參數，包含株高、葉面積、綠度、NDVI、NPCI 及 PSRI

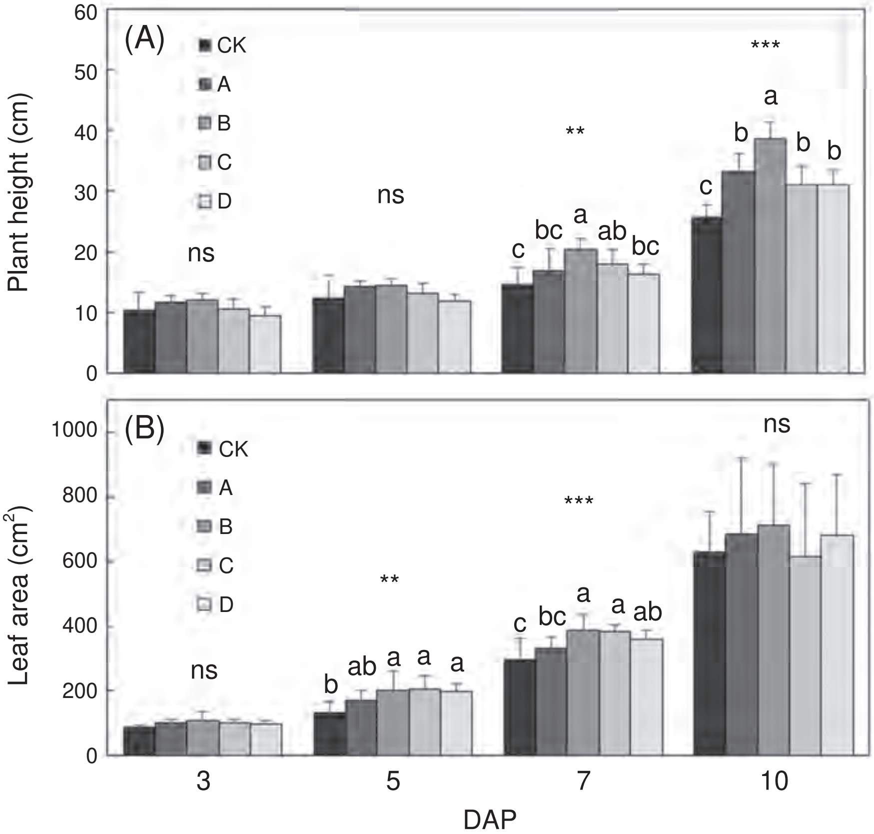

圖 3. 不同土壤益生菌處理 (A、B、C、D) 下胡瓜第 3、5、7、10 天生長情形，(A) 株高、(B) 葉面積。DAP：定植後天數 (days after planting)；誤差線為平均值標準差 (N = 8)。各組平均值上星號及 ns 分別表示 ANOVA 結果顯示平均值間有顯著差異 (*,**,***P < 0.05, 0.01, 0.001) 及不顯著差異 (non-significant)，相同英文字母則表示 5% 水準下經最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗未達顯著差異。

Fig. 3. Cucumber growth parameters, (A) plant height and (B) leaf area, at 3, 5, 7, and 10 d after planting (DAP) under different soil microbe treatments (A, B, C and D). Error bar is the standard deviation of the mean (N = 8). Star and ns represent significant and non-significant differences separately by analysis of variance (ANOVA). The same letter means that two treatments are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

(圖 5)。試驗結果顯示，在生物量相關參數，如株高及葉面積等，0% 氮含量處理的成長曲線較為和緩，試驗組以 100% 氮含量處理株高生長較快，50% 氮含量處理次之。在植物生理活力指標方面，NDVI 為最常見之植物生長指標，可間接估計光合作用效能及淨初級產量 (Peñuelas *et al*. 1994)；PSRI 偵測胡蘿蔔素與葉綠素含量比例，可作為葉片老化及果實成熟指標，數值越高表示葉片老化程度越高 (Merzlyak *et al*. 1999; Das & Seshasai 2015)；NPCI 則反應全部色素與葉綠素含量比例，為植株生理狀況指標，尤其對氮含量較為敏感 (Peñuelas *et al*. 1994; Bannari *et al*. 2007)。綜合此些指標顯示，0% 氮含量處理之葉片老化最為明顯，其餘含氮處理組之生長狀況較亦可看出差異，尤其以 NPCI 最能反應植株氮含量之差異。NPCI 指標顯示，定植後第 5 天對照組與實驗組出現差異 (5% 信心水準下 LSD 檢測達顯著差異)，第 6 天試驗組中 50% 氮含量處理與 100% 氮含量、200% 氮含量處理出現差異，到了定植後第 8 天，4 個處理間具 LSD 顯著差異。此說明了以 200% 氮含量處理可顯著提升葉片中葉綠素含量，但在葉面積部分定植後 10 d，成長曲線趨於平緩，須注意 200%

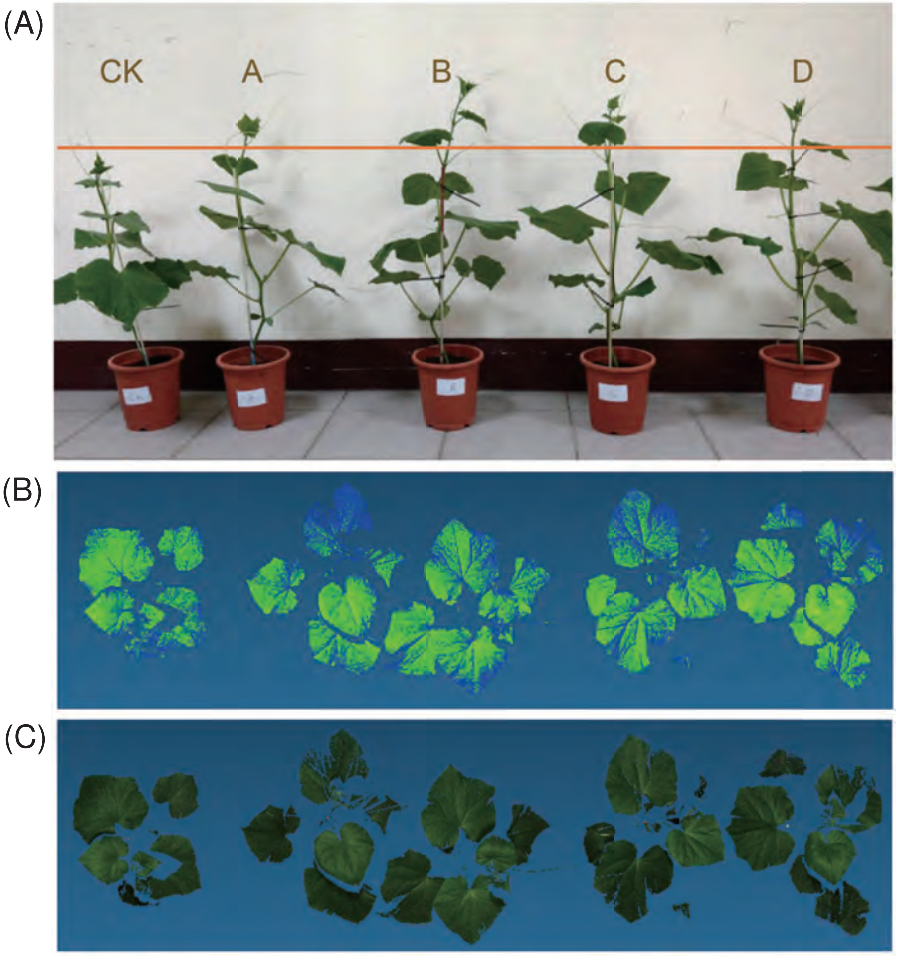

圖 4. 不同土壤益生菌處理 (A、B、C、D) 下，胡瓜 (A) 定植後 13 d 植株外觀及 (B、C) 定植後 11 d 俯視 3D 圖。由左至右分別為對照組、A、B、C 及 D 處理。

Fig. 4. Effects of different soil microbes (A, B, C and D) supplied on cucumber. (A) Side-view of cucumbers on the 13th day after planting; and (B, C) the top-view 3D plot on the 11th day after planting.

氮含量處理氮含量對蕃茄定植初期可能過多。部分試驗數據有大幅波動情形，推測為受環境光線影響所致，由於三維雷射掃描器是偵測雷射光反射訊號，會受環境強光或陰影影響反射光接收，進一步造成數據變動，因此在判讀數據時以長期趨勢進行解讀。

透過上述兩個自動化植物表型體設施應用於蔬菜栽培的應用案例，其非破壞式、連續收集外表型資料之優點，有助於判定植株生長差異以及差異出現之時間點。此外，自動化三維雷射掃描器除了收集基本生物量相關參數，亦可搭配 4 種光譜波段 (紅、綠、藍及近紅外光) 偵測多種植物生長指標，進行各株植株大面積生理分析，使植物生理活力變成可量化評估之參數。

結語

本研究結果顯示，傳統人工量測與自動掃描之數據具高度相關性，尤其以甜瓜 (葉大而平且快速生長之中型植物) 最佳，小油菜 (葉輪生之小型植物) 次之，大豆 (葉小而多之中型植物) 雖不如前兩者相關性高，但生育中期

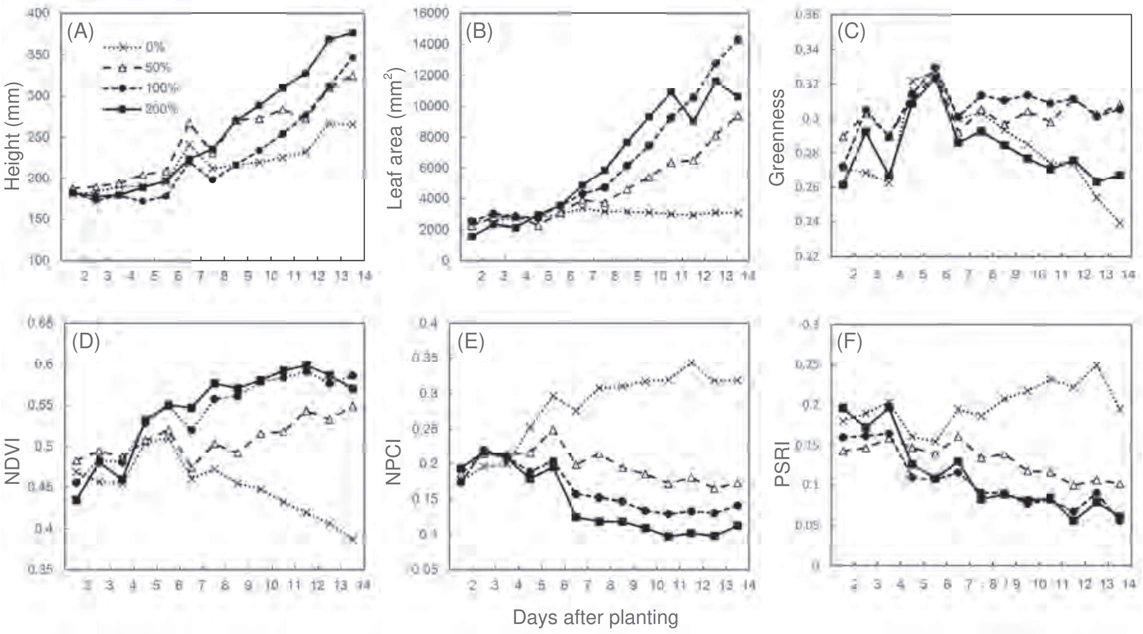

圖 5. 不同氮含量配方對番茄生長之影響。(A) 株高；(B) 葉面積；(C) 綠度；(D) NDVI；(E) NPCI；及 (F) PSRI。

Fig. 5. Growth of tomato under different nitrogen concentration treatments. (A) Plant height; (B) leaf area; (C) greenness; (D) normalized difference vegetation index (NDVI); (E) normalized pigments chlorophyll ratio index (NPCI); and (F) plant senescence reflectance index (PSRI).

相關係數仍達 0.8 以上。綜此顯示，農試所之自動化植物表型體設施可用於進行植物外表型重要參數之收集。此外，經由本研究中連續收集之參數顯示，傳統人工量測與自動掃描數據之相關係數除了與上述物種間差異有關，亦與各作物生長時期相關。以系統預設之量測範圍為例，植株株高 < 5 cm、橫向生長 > 40 cm 以及葉片相互遮蔽將容易導致三維掃描器之量測誤差。因此，未來使用自動化植物表型體設施，需針對待測植物調整量測範圍，本套系統配置之三維掃描器最大量測寬度可達 60 cm，最佳解析度可達 1 mm，將可適用於大多數蔬菜作物栽培及育種研究，亦可協助各式種原進行性狀紀錄。

農試所建置之自動化植物表型體設施，每小時可進行約 200 株植物之掃描及分析，除了得到生物量相關參數 (如株高、葉面積等)，亦可透過多項生理指標瞭解植物生長狀況。因此，將可使外表型調查試驗更加快速、客觀，且具有非破壞性及連續性偵測之優點。雖然，本次試驗的胡瓜、番茄等作物相關自動化外表型分析，未配合傳統外表型分析調查結果，但雷射三維掃描器，已在植物外表型分析上有廣泛且深入的研究 (Paulus *et al*. 2014; Maphosa *et al*. 2017)。同時，相關植生指標已被廣泛應用在廣泛作物的外表型分析 (Hatfield & Prueger 2010; Hatfield *et al*. 2019; Kokhan & Vostokov 2020)。爰此，本次試驗分析結果，應具相當可信度。然而，目前雖可進行全株植物多項參數量測，但無法針對特定部位進行量測分析，雷射掃描器提供之資訊也僅限於植株外部資訊。因此，未來將持續擴充多種感測器，如高光譜、熱影像鏡頭等，並由影像分析、育種、植物生理、病蟲害及栽培等專家組成團隊，期盼完善自動化植物表型體設施，使植物外表型分析更快速、省工、精準、自動化。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 107 農科

-20.1.1-農-C3 及 108 農科-19.1.1-農-C2 計畫經費支持，以及本所植病組蘇俊峰博士提供胡瓜苗及土壤微生物製劑，謹致謝忱。

引用文獻

Bannari, A., K. S. Khurshid, K. Staenz, and J. W. Schwarz. 2007. A comparison of hyperspectral chlorophyll indices for wheat crop chlorophyll content estimation using laboratory reflectance measurements. IEEE Trans. Geosci. Remote Sens. 45:3063–3074. doi:10.1109/TGRS.2007.897429

Chen, D., K. Neumann, S. Friedel, B. Kilian, M. Chen, T. Altmann, and C. Klukas. 2014. Dissecting the phenotypic components of crop plant growth and drought responses based on high-throughput image analysis. Plant Cell 26:4636–4655. doi:10.1105/tpc.114.129601

Das, P. K. and M. V. R. Seshasai. 2015. Multispectral sensor spectral resolution simulations for generation of hyperspectral vegetation indices from Hyperion data. Geocarto Intl. 30:686–700. doi:10.1080/10106049.2014.973065

Fang, W., H. Feng, W. Yang, L. Duan, G. Chen, L. Xiong, and Q. Liu. 2016. High-throughput volumetric reconstruction for 3D wheat plant architecture studies. J. Innov. Opt. Health Sci. 9:1650037. doi:10.1142/S1793545816500371

Hatfield, J. L. and J. H. Prueger. 2010. Value of using different vegetative indices to quantify agricultural crop characteristics at different growth stages under varying management practices. Remote Sens. 2:562–578. doi:10.3390/rs2020562

Hatfield, J. L., J. H. Prueger, T. J. Sauer, C. Dold, P. O'Brien, and K. Wacha. 2019. Applications of vegetative indices from remote sensing to agriculture: Past and future. Inventions 4:71. doi:10.3390/inventions4040071

Jaganathan, D., A. Bohra, M. Thudi, and R. K. Varshney. 2020. Fine mapping and gene cloning in the post-NGS era: Advances and prospects. Theor. Appl. Genet. 133:1791–1810. doi:10.1007/s00122-020-03560-w

Khorsandi, A., A. Hemmat, S. A. Mireei, R. Amirfattahi, and P. Ehsanzadeh. 2018. Plant temperature-based indices using infrared thermography for detecting water status in sesame under greenhouse conditions. Agric. Water Manag. 204:222–233. doi:10.1016/j.agwat.2018.04.012

Kjaer, K. H. and C. O. Ottosen. 2015. 3D Laser triangulation for plant phenotyping in challenging environments. Sensors 15:13533–13547. doi:10.3390/s150613533

Knoch, D., A. Abbadi, F. Grandke, R. C. Meyer, B. Samans, C. R. Werner, R. J. Snowdon, and T. Altmann. 2020. Strong temporal dynamics of QTL action on plant growth progression revealed through high-throughput phenotyping in canola. Plant Biotechnol. J. 18:68–82. doi:10.1111/pbi.13171

Kokhan, S. and A. Vostokov. 2020. Using vegetative indices to quantify agricultural crop characteristics. J. Ecol. Eng. 21(4):120–127. doi:10.12911/22998993/119808

Mao, H., W. Zhu, and H. Liu. 2014. Determination of nitrogen and potassium content in greenhouse tomato leaves using a new spectro-goniophotometer. Crop Pasture Sci. 65:888–898. doi:10.1071/CP13391

Maphosa, L., E. Thoday-Kennedy, J. Vakani, A. Phelan, P. Badenhorst, A. Slater, G. Spangenberg, and S. Kant. 2017. Phenotyping wheat under salt stress conditions using a 3D laser scanner. Isr. J. Plant Sci. 64(3–4):55–62. doi:10.1080/07929978.2016.1243405

Merzlyak, M. N., A. A. Gitelson, O. B. Chivkunova, and V. Y. Rakitin. 1999. Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. Physiol. Plant. 106:135–141. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106119.x

Natarajan S., H. T. Kim, S. K. Thamilarasan, K. Veerappan, J. I. Park, and I. S. Nou. 2016. Whole genome re-sequencing and characterization of powdery mildew disease-associated allelic variation in melon. PLoS One 11:e0157524. doi:10.1371/journal.pone.0157524

Paulus, S., H. Schumann, H. Kuhlmann, and J. Léon. 2014. High-precision laser scanning system for capturing 3D plant architecture and analysing growth of cereal plants. Bioprocess Biosyst. Eng. 121:1–11. doi:10.1016/j.biosystemseng.2014.01.010

Peñuelas, J., J. A. Gamon, A. L. Fredeen, J. Merino, and C. B. Field. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. Remote Sens. Environ. 48:135–146. doi:10.1016/0034-4257(94)90136-8

Perez-Sanz, F., P. J. Navarro, and M. Egea-Cortines. 2017. Plant phenomics: An overview of image acquisition technologies and image data analysis algorithms. GigaScience 6:gix092. doi:10.1093/gigascience/gix092

Prashar, A. and H. G. Jones. 2014. Infra-red thermography as a high-throughput tool for field phenotyping. Agronomy 4:397–417. doi:10.3390/agronomy4030397

Römer, C., M. Wahabzada, A. Ballvora, F. Pinto, M. Rossini, C. Panigada, J. Behmann, J. Léon, C. Thurau, C. Bauckhage, K. Kersting, U. Rascher, and L. Plümer. 2012. Early drought stress detection in cereals:

Simplex volume maximisation for hyperspectral image analysis. Funct. Plant Biol. 39:878–890. doi:10.1071/FP12060

Rousseau, C., E. Belin, E. Bove, D. Rousseau, F. Fabre, R. Berruyer, J. Guillaumès, C. Manceau, M. A. Jacques, and T. Boureau. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. Plant Methods 9:17. doi:10.1186/1746-4811-9-17

Rumpf, T., A. K. Mahlein, U. Steiner, E. C. Oerke, H. W. Dehne, and L. Plümer. 2010. Early detection and classification of plant diseases with support vector machines based on hyperspectral reflectance. Comput. Electron. Agric. 74:91–99. doi:10.1016/j.compag.2010.06.009

Thomas, S., J. Behmann, A. Steier, T. Kraska, O. Muller, U. Rascher, and A. K. Mahlein. 2018. Quantitative assessment of disease severity and rating of barley cultivars based on hyperspectral imaging in a non-invasive, automated phenotyping platform. Plant Methods 14:45. doi:10.1186/s13007-018-0313-8

Tian, G. W., A. Mohanty, S. N. Chary, S. Li, B. Paap, G. Drakakaki, C. D. Kopec, J. Li, D. Ehrhardt, D. Jackson, S. Y. Rhee, N. V. Raikhel, and Vitaly Citovsky. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta. Plant Physiol. 135:25–38. doi:10.1104/pp.104.040139

Vadez,V., J. Kholová, G. Hummel, U. Zhokhavets, S. K. Gupta, and C. T. Hash. 2015. LeasyScan: A novel concept combining 3D imaging and lysimetry for high-throughput phenotyping of traits controlling plant water budget. J. Exp. Bot. 66:5581–5593. doi:10.1093/jxb/erv251

Vaughan, R. G., D. Bergfeld, W. C. Evans, S. Wilkinson, C. Miwa, and M. Diabat. 2018. A baseline thermal infrared survey of ground heating around the Casa Diablo Geothermal Plant, Mammoth Lakes, CA. Geoth. Res. T. 42:952–966.

Xiao, Y., H. Liu, L. Wu, M. Warburton, and J. Yan. 2017. Genome-wide association studies in maize: Praise and stargaze. Mol. Plant 10:359–374. doi:10.1016/j.molp.2016.12.008

Yang, W., Z. Guo, C. Huang, L. Duan, G. Chen, N. Jiang, W. Fang, H. Feng, W. Xie, X. Lian, G. Wang, Q. Luo, Q. Zhang, Q. Liu, and L. Xiong. 2014. Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. Nat. Commun. 5:5087. doi:10.1038/ncomms6087

Yang, W., H. Feng, X. Zhang, J. Zhang, J. H. Doonan, W. D. Batchelor, L. Xiong, and J. Yan. 2020. Crop phenomics and high-throughput phenotyping: Past decades, current challenges and future perspectives. Mol. Plant 13:187–214. doi:10.1016/j.molp.2020.01.008

Yuan, L., Y. Huang, R. W. Loraamm, C. Nie, J. Wang, and J. Zhang. 2014. Spectral analysis of winter wheat leaves for detection and differentiation of diseases and insects. Field Crops Res. 156:199–207. doi:10.1016/j.fcr.2013.11.012

Application of Plant Phenomics Platform for Automatic Phenotyping of the Vegetable Crops

Ssu-Yu Lin[1], Yuan-Kai Tu[1], Shuen-Chi You[1], Yue-Ying Fu[2], and Da-Gin Lin[3,*]

Abstract

Lin, S. Y., Y. K. Tu, S. C. You, Y. Y. Fu, and D. G. Lin. 2021. Application of plant phenomics platform for automatic phenotyping in the vegetable crops. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):11–23.

With the vigorous development of genomic sequencing techniques, crop breeding has entered an era of high-throughput and big data in genomic analysis. However, the relative phenotyping techniques did not keep up with the development of genotyping techniques and have become a bottleneck for breeding development. The development of a high-throughput plant auto-phenotyping platform is becoming an important issue in crop breeding. For this purpose, a plant auto-phenotyping platform has been established deploying a 3-dimensional laser scanner. First, the auto-phenotyping parameters of soybean, rapeseed, and melons were validated by comparing them with the analysis of traditional manual phenotyping. The results indicate that the parameters of plant high, leaf area, and biomass all are highly correlated between the auto-phenotyping platform and the traditional one ($r > 0.85^{***}$). Then, this platform has been applied to the phenotyping of the cultivation of the other 2 vegetables. The first case was conducted on the effects of different soil microbial agents for the growth of cucumber, and the second one was conducted on the effects of different nitrogen content formula for the growth of tomato. The results showed that 4 commercially available soil microbial products could improve the growth of cucumber and the formula with different nitrogen contents did significantly affect tomato growth. These results suggest that the established auto-phenotyping platform can save labor and collect continuously phenotyping data. It is applicable and useful for the users to analyze the diversities among plant growth stages as well as treatments. This platform has the advantages of fast, high-throughput, objective and non-invasive for phenotyping analysis, and is helpful for the development of crop breeding.

Key words: Plant phenomics platform, High-throughput phenotyping data, 3-dimensional laser scanner, Crop.

Received: August 18, 2020; Accepted: October 26, 2020.
* Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):24–42 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0003

研究報告

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 防治馬鈴薯青枯病之探討

黃仁麒[1] 吳雅芳[2] 蔡佳欣[3] 周浩平[4] 林宜賢[5] 陳穎練[6,*]

摘要

黃仁麒、吳雅芳、蔡佳欣、周浩平、林宜賢、陳穎練。2021。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 防治馬鈴薯青枯病之探討。台灣農業研究 70(1):24–42。

茄科青枯病為馬鈴薯和番茄重要細菌性病害，由青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 引起，除健康種苗、水旱輪作及合理化施肥等防治方法外，另有推薦液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01。本實驗室曾發現液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 對馬鈴薯瘡痂病具防治效果，但目前 Ba01 或 PMB01 對馬鈴薯青枯病之防治仍未有相關研究。本文研究發現 Ba01 可產生蛋白酶、澱粉酶、纖維素酶、脂酶等胞外水解酶，並具溶磷能力。與已上市之 PMB01 相比，Ba01 具有較佳的澱粉、蛋白質、纖維素分解能力及溶磷效果。此外，Ba01 在泳動、表面移行與生物膜生成的能力亦較佳。對峙培養試驗發現，Ba01 與 PMB01 皆可以抑制馬鈴薯青枯病菌 race 1 菌株 RSN371 與 race 3 菌株 RSN245、RSN373、RSN439 之生長。然而，混合 Ba01 與 PMB01，並未較單獨施用 Ba01 或 PMB01 獲得更佳拮抗青枯病菌之效果。此 4 株青枯病菌以 RSN439 具較強毒力，故作為後續試驗菌株。於盆栽試驗中，單獨接種 RSN439 罹病度達 100%，而在分別澆灌 Ba01 或 PMB01 後，其罹病度顯著降至 20% ($P = 0.0009$) 與 40% ($P = 0.0135$)。於植物的防禦反應，發現同時接種 RSN439 與 Ba01 或 PMB01 能增加活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 於馬鈴薯葉片的累積。總結，液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 可有效防治馬鈴薯青枯病，其作用機制可能與抑制病原菌、胞外分解酶的分泌、溶磷作用及誘導 ROS 累積有關。

關鍵詞：馬鈴薯青枯病、青枯病菌、液化澱粉芽孢桿菌、生物防治。

前言

馬鈴薯青枯病為馬鈴薯重要的細菌性病害之一，由土壤傳播病原菌 *Ralstonia solanacearum* 引起，病菌可透過自然開口或傷口進入寄主植物，並自維管束快速入侵木質部定殖 (colonization)，釋放大量胞外多醣類 (exopolysaccharide) 以阻止木質部的水分運輸 (Peeters *et al*. 2013)。前期病徵似缺水狀，由上位葉開始萎凋，葉片仍呈綠色，傍晚葉片恢復正常，後期病徵擴展至全株，甚至導致全株死亡。青枯病多發生在馬鈴薯植株生長後期至結薯形成前期，莖基部病徵橫切後可發現維管束褐化及產生白色菌流 (Álvarez *et al*. 2010)。青枯病菌依寄主不同，分為五個小種 (race)，第一小種 (race 1) 感染寄主最廣，例茄子、番茄、菸草、胡椒及部分雜草；第二小種 (race 2) 可感染三倍體香蕉及赫蕉屬植物；第三小種 (race 3) 主要感染馬鈴薯及番茄，對於其他茄科作物之毒性較弱；第四生理小種 (race 4) 僅感染薑；第五生理小種 (race 5) 則僅感染桑 (Denny 2007)。透過感

投稿日期：2020 年 9 月 3 日；接受日期：2020 年 11 月 26 日。
* 通訊作者：ychen28@ntu.edu.tw
[1] 國立台灣大學植物醫學碩士學位學程碩士生。台灣 台北市。
[2] 農委會台南區農業改良場作物環境課副研究員。台灣 台南市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會高雄區農業改良場作物環境課副研究員。台灣 高雄市。
[5] 國立屏東科技大學植物醫學系教授。台灣 屏東縣。
[6] 國立台灣大學植物病理與微生物學系副教授。台灣 台北市。

染不同植物，可以進行生理小種的傳統鑑定。其中，race 1 與 race 3 可感染馬鈴薯；不同於 race 1，race 3 較耐寒，在 16℃以下仍具感染能力 (Ciampi & Sequeira 1980; Wu *et al*. 2011)。另，可依對 9 種碳水化合物 [乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙醣 (cellobiose)、甘露醣醇 (mannitol)、山梨聚醣醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol)、海藻醣 (trehalose)、肌醇 (myo-inositol)、D-核糖 (D-ribose)] 之利用能力，區分為 6 種生化型 (biovar)。而最新的分類系統，則是以不同 DNA 分析技術將其分為 4 個演化群 (phylotype)。Phylotype I 菌株主要分布於亞洲，寄主為茄科作物；phylotype II 分布於歐美，寄主廣泛，為馬鈴薯、香蕉、番茄；phylotype III 分布於非洲，寄主為番茄；phylotype IV 分布於印尼，寄主為香蕉、番茄 (Denny *et al*. 2007)。

液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 為格蘭氏陽性菌，桿狀具周生鞭毛，屬好氣性、活動力強及無莢膜的細菌，可生長於 pH 2–10 的環境，生長最適溫度為 30–40℃，具耐高溫及產生內生孢子 (endospore) 之特性。內生孢子為特殊的休眠體，能產生極強的抗逆境能力，對酸鹼、高溫、高滲透及輻射均有強耐受性。芽孢桿菌防治作物病害的機制分為直接與間接促進植物生長。直接促進植物生長的途徑包括植物荷爾蒙吲哚-3-乙酸 (indole acetic acid; IAA) 與吉貝素 (gibberellin) 的合成 (Chen *et al*. 2010; Almoneafy *et al*. 2014)、溶磷作用和胞外分解酶的分泌以調節根部活化作用，促進植物生長以抵抗外來病原菌 (Bloemberg & Lugtenberg 2001)。間接促進植物生長的途徑包括產生抗生物質 (Pal & Gardener 2006; Chen *et al*. 2010)、嵌鐵物質 (Arguelles-Arias *et al*. 2009)、競爭作用 (Pal & Gardener 2006; Chowdhury *et al*. 2015)、揮發物質的產生 (Chowdhury *et al*. 2015) 及誘導植株產生抗病性 (induced resistance) (Kuo *et al*. 2014)。因此，液化澱粉芽孢桿菌具開發成為生物肥料或生物農藥之潛力。供試菌株 *B. amyloliquefaciens* Ba01 由馬鈴薯薯皮所分離，並由前人發現其對馬鈴薯瘡痂病具防治效果 (Lin *et al*. 2018)；PMB01 為已上市生物防治菌，商品名為救你一命與絕症剋星 (嘉農，台灣新竹市) (Chou *et al*. 2013)，推薦於防治茄科青枯病及萎凋病；PMB05 可抑制草莓炭疽病菌 (Wu 2016) 及西瓜果斑病菌 (Chang *et al*. 2019) 發生，亦具有提升植物免疫能力。植物經病原菌感染後，植物組織產生過敏性反應 (hypersensitive response) 的同時會誘導生成超氧化物 (O_2^-)，經 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 氧化酶氧化成 H_2O_2，而 H_2O_2 作為活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 可視為訊號分子進一步誘導其他防禦機制，如基因表現、癒傷葡聚醣 (callose) 累積等 (Doke 1985)。除此機制，亦可透過吲哚乙酸、水楊酸、乙烯、離層素的產生、PAMP (pathogen associated molecular pattern) triggered immunity (PTI) 及環境壓力等誘導 ROS 的累積 (Mittler *et al*. 2011)。

2013–2014 年間，雲林縣及嘉義縣馬鈴薯種植區的青枯病發病率為 0–32% (Chuang *et al*. 2015)。目前防治方法包括健康種薯、燒毀病株、與水稻、小米、高粱、玉米等進行輪作 (Yuliar *et al*. 2015)。而生物農藥方面，僅台灣推薦液化澱粉芽孢桿菌 PMB01，但其防治效果仍未知。本試驗使用液化澱粉芽孢桿菌 Ba01，並與已商品化之 PMB01 比較其抑菌能力、胞外水解酶的分泌、溶磷能力、誘導 ROS 累積及其對馬鈴薯青枯病之防治能力，評估 Ba01 與 PMB01 使用於防治馬鈴薯青枯病之可能性。

材料與方法

試驗菌株與培養基製備

本試驗使用之液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 與馬鈴薯青枯病菌 (*R. solanacearum*) 菌株列舉於表 1。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01、PMB01 與 PMB05 培養於 LB 液態培養基 [Luria-Bertani liquid medium，1% Tryptone (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1% NaCl (Bioshop, Burlington, Canada)、0.5% yeast extract (Bioshop, Burlington, Canada)]/固態 [1.5% agar (Bioshop, Burlington, Canada)]，溫度為 37℃。馬鈴薯青枯病菌 RSN245、RSN371、

表 1. 本研究使用之菌株，RSN371 與 RSN373 分離於同一田區，但不同植株；RSN245、RSN371 及 RSN439 則分離自不同田區。

Table 1. Strains used in this study. RSN371 and RSN373 were isolated from same field but different plants. RSN245, RSN371 and RSN439 were isolated from different field.

Microorganism	Strain	Source or reference	Collection area	Isolation site
Biocontrol agent				
Bacillus amyloliquefaciens	Ba01	Lin *et al*. (2018)	Houli, Taiwan	Potato tuber
	PMB01	Chou *et al*. (2013)	Neipu, Taiwan	Soil
	PMB05	Wang *et al*. (2019)	Neipu, Taiwan	Soil
Pathogen				
Ralstonia solanacearum	RSN245 (race 3)	This study	Dounan, Taiwan	Potato stem
	RSN371 (race 1)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato stem
	RSN373 (race 3)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato stem
	RSN439 (race 3)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato tuber

RSN373 及 RSN439，於雲林縣斗南及古坑地區採集而得，以 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 鑑別性培養基 [0.1% casamino acid、1% peptone、0.5% glucose、1% 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)、1.7% agar] 鑑定菌落型態 (Kelman 1954)。試驗時，則培養於 CPG 液態培養基 [0.1% casamino acid (Bioshop, Burlington, Canada)、1% peptone (Bioshop, Burlington, Canada)、0.5% glucose (Bioshop, Burlington, Canada)]/ 固態 (1.7% agar)，溫度為 28℃。再利用專一性引子對 AU759 (GTCGCCGTCAACTCACTTTCC) 和 AU760 (GTCGCCGTCAGCAATGCGGAA) (Opina *et al*. 1997; Villa *et al*. 2003) 確認菌株為青枯病菌，又分別以 race 1 和 race 3 專一性引子對 PS-IS-F (CGCAACGCTGGATGAACCC)、PS-IS-R (CAGACGATGCGAAGCCTGAC) (Lee *et al*. 2001)、630 (ATACAGAATTCGACCGGCAC)、631 (AATCACATGCAATTCGCCTAC) (Fegan *et al*. 1998) 鑑別生理小種。

胞外水解酶之定性分析

大部分液化澱粉芽孢桿菌菌株具分泌蛋白酶、澱粉酶、纖維素酶及脂酶的能力，且具備溶磷能力 (Lin 2015)。本研究使用不同培養基，測試液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 菌株是否具有分泌這些酵素之能力。蛋白質分解酵素活性測試之培養基配方，為利用 100 mL 的基礎培養基 (2% peptone、3.2% agar) 及含 2% 脫脂奶粉的 100 mL dH_2O，兩者分別滅菌後，將其均勻混合。將 Ba01 與 PMB01 劃於此培養基，2 d 後觀察是否產生透化圈 (Sonune & Garode 2018)。而澱粉分解能力測試，乃利用 0.2% soluble starch (藥理純藥株式會社，日本宇治市)，1.6% agar 加入 100 mL dH_2O 混勻配置。培養 2 d 後，將培養基上的 Ba01 或 PMB01 菌落水洗後加入碘液 (杏輝，台灣宜蘭縣) 至培養基中，若能產生透化圈則表示具有澱粉分解能力 (Sonune & Garode 2018)。纖維素酶活性測試，則以纖維素培養基 [1% peptone、1% yeast extract、1% carboxymethyl cellulose (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.5% sodium chloride、0.1% monopotassium phosphate (ShimakYU's Pure Chemicals, Osaka, Japan)、1.6% agar 加入 100 mL dH_2O，pH7] 進行培養。培養 2 d 後，利用 dH_2O 水洗將培養基上的 Ba01 或 PMB01 菌落，再使用 0.1% 之 Congo red (Bio Basic Canada, Markham, Canada) 染色 1 h，再以 1 M sodium chloride 退染 1 h，透化區的產生代表具有分解纖維素之能力 (Kasana *et al*. 2008)。脂酶活性測試，則使用 Tween 80 培養基 [1% peptone、0.5% sodium chloride、0.01% calcium chloride (MPBio Inc, Irvine, CA, USA)、1% Tween 80 (Biotech, Paris, France)、1.6% agar 加入 100 mL dH_2O，pH 7] 分析。培養於 Tween 80 培養基 5 d 後，

利用 dH_2O 水洗將培養基上之 Ba01 或 PMB01 菌落，再觀察菌落附近是否有沉澱物之產生 (Sonune & Garode 2018)。溶磷能力測試，乃使用 Pikovskayas 培養基 [0.05% yeast extract、0.5% calcium phosphate、1% glucose (Bioshop, Burlington, Canada)、0.05% ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.02% potassium chloride (Bioshop, Burlington, Canada)、0.01% magnesium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1.5% agar 與 0.00001% manganese sulphate (Santoku Chemical Company, Osaka, Japan) 和 0.00001% ferrous sulphate (ShimakYU's Pure Chemicals, Osaka, Japan)] 分開滅菌後，再將其均勻混合，總體積 400 mL 進行分析。培養 5 d 後，利用 dH_2O 將培養基上之 Ba01 或 PMB01 菌落，再觀察是否有透化圈的產生，其代表溶磷能力 (Almoneafy *et al*. 2014)。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 皆滴定 3 μL [1.0 OD_{600} (optical density; OD)] 的菌液至培養基進行試驗，並培養於 37℃。

濾紙片擴散試驗

將 Ba01 與 PMB01 液態搖瓶培養於 37℃、16 h，而青枯病菌 RSN245、RSN371、RSN373 及 RSN439 則液態搖瓶培養於 28℃、48 h。利用 dH_2O 將 Ba01 與 PMB01 濃度調整為 1.0 OD_{600} (約 10^8 cfu mL^{-1})，青枯病菌濃度調整為 1.0 OD_{600} (約 3×10^9 cfu mL^{-1})。接著，將 4 株馬鈴薯青枯病菌懸浮液以玻璃珠均勻塗抹於 CPG 固態培養基，並放置於無菌操作台風乾 20 min。之後，再將直徑 6 mm 的濾紙片放置於 CPG 固態培養基，分別滴 3 μL Ba01 或 PMB01，對照組為 3 μL dH_2O。放置於 28℃ 生長箱培養 3 d 後以游標卡尺測量 Ba01 與 PMB01 抑制馬鈴薯青枯病菌的抑制圈 (Singh *et al*. 2016; Lin *et al*. 2018)。

液化澱粉芽孢桿菌可以不同作用機制抑制病原菌，其二次代謝物的產生亦具防治病原菌的潛能，因此取液化澱粉芽孢桿菌濾液對青枯病菌進行抑菌測試。首先取 Ba01 與 PMB01 單一菌落培養於 LB 液態培養基中 16 h，隔天稀釋至 0.1 OD_{600}，體積為 5 mL。培養 3 d 後，將試管以 2,851× *g* 離心 7 min，並取 1.5 mL 上清液於微量離心管，以轉速 12,470× *g*、8 min 離心 2 次，最後以 0.22 μm 的 millipore filter (Millex-GS, MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) 過濾，並存於 4℃備用。同時製備青枯病菌懸浮液，沾取固態 CPG 培養基上的青枯病菌，培養於 CPG 液態培養基過夜後離心 (2,851× *g*，6 min)，以 dH_2O 稀釋至 1.0 OD_{600}，再以青枯病菌菌液：液化澱粉芽孢桿菌濾液：CPG 培養基 = 1：2：7 之比例配置成 3 mL 之培養液，培養於 28℃，轉速為 2.68× *g*。2 d 後，稀釋塗盤於 CPG 固態培養基，以進行青枯病菌之菌落計算。

細菌的移動能力與生物膜之形成有關，進而影響芽孢桿菌防治病原菌的能力。其移動方式分為液態中的泳動 (swimming) 與固態表面的移行 (swarming)，為測試此種能力，分別使用含 0.3% 和 0.7% agar 之 LB 培養基。芽孢桿菌先培養 16 h，再將濃度調至 1.0 OD_{600}，並以體積 3 μL 滴定於培養基中央，觀察其菌落在培養於 37℃、8 h 後菌落擴散的範圍並進行統計分析 (Lin 2015; Cao *et al*. 2018)。

Ba01 與 PMB01 拮抗馬鈴薯青枯病菌之加乘作用測試

經過對峙培養試驗得知，Ba01 與 PMB01 皆具抑制馬鈴薯青枯病菌之能力，雖然 Ba01 與 PMB01 抑制青枯病菌所產生之抑制圈不盡相同，PMB01 抑制 4 株青枯病菌的能力亞於 Ba01。因此，欲評估同時使用 Ba01 與 PMB01 是否可提高抑制馬鈴薯青枯病菌之能力。分別培養芽孢桿菌與青枯病菌於 LB 與 CPG 固態培養基，沾取單一菌落並分別培養於 LB 與 CPG 液態培養基一晚 (芽孢桿菌培養於 37℃、10.73× *g*；青枯病菌培養於 28℃、2.68× *g*)。將青枯病菌 RSN245、RSN371 懸浮液以 100 μL (1.0 OD_{600})，青枯病菌 RSN373、RSN439 懸浮液則以 200 μL (1.0 OD_{600}) 利用玻璃珠進行塗盤，於無菌操作台內開蓋風乾約 20 min。等待期間，分別取 500 μL (1.0 OD_{600}) 之 Ba01 和 500 μL (1.0 OD_{600}) 之 PMB01 均勻混合於微量離心管。20 min 後，將滅菌過之 6 mm 濾紙片放入培養基，將 3 μL Ba01、PMB01 或 3 μL Ba01 + PMB01 混合液滴於 6 mm 濾紙片上，

培養於 28℃生長箱。2 d 後利用游標尺進行抑制圈之觀察，如 Ba01 或 PMB01 分別與 Ba01 + PMB01 相比之 $P < 0.05$，則具加乘作用。另，測試 Ba01 與 PMB01 之生長速率，取 2 株芽孢桿菌，調整至 0.1 OD_{600}，培養於 10 mL 液態 LB 培養基 (37℃)，並分別於 0、3、6、9、12、24 及 36 h 進行濃度測定，利用 GraphPad Prism version 8.0.2，以 two-way analysis of variance (ANOVA) 進行統計分析。

生物膜形成測定

將液化澱粉芽孢桿菌培養於 5 mL LB 液態培養基，並培養 16 h，利用分光光度計將培養菌液稀釋至 0.1 OD_{600}，於 37℃下再培養 4 h 增幅菌量。4 h 後，再以 LB 液態培養基稀釋至 0.1 OD_{600}，並以每孔 1,000 μL 之菌量滴入 12 孔盤中 (Haggag & Timmusk 2008)。每個處理組皆為 3 重複，於 37℃下培養 48 h，再以 1,000 μL dH_2O 沖洗菌落 2 次後，每孔滴入 1,000 μL 之 0.1 % crystal violet (Sigma, St. Louis, MO, USA)。於室溫下進行染色 10 min，再利用 1,000 μL dH_2O 沖洗 4 次。完成沖洗的 12 孔盤放置晾乾 24 h 後，每孔加入 2,000 μL 之 30% acetic acid 以溶解 crystal violet (Arrebola *et al*. 2010; Algburi *et al*. 2020)。靜置 10 min 後，以 100 μL 分裝至 96 孔盤中，以吸光值 OD_{600} 上機檢測。將 Ba01 之 OD_{600} 設為 100%，並計算 PMB01 之生物膜生成百分比，進行比較。以同樣的培養條件進行 Ba01 與 PMB01 的生長速率測試，並於 0、3、6、9、12、24、36、48 h 進行濃度測定。試驗期間如產生生物膜，需將其打碎並與細菌懸浮液混合均勻再進行檢測。試驗統計利用 GraphPad Prism version 8.0.2，以 two-way ANOVA 進行統計分析。

四株馬鈴薯青枯病菌之毒力測試

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 薯塊購自台中市潭子區農會產銷班，品種為「克尼伯」(‘Kennebec’)。種植馬鈴薯前，先以水洗薯塊表面，表面噴灑 75% 酒精，放置於陽台經太陽曝曬。待芽點萌芽且轉變成綠色後，以 1 個芽點為單位切成小薯塊，再將其浸泡於 400 mg L^{-1} 次氯酸水 (歐克靈，台灣台北市) 30 min，於 25℃生長箱內風乾 1 晚即可種植。栽培介質使用泥炭土 (Euflor, Schermbeck, Germany)、蛭石 (蔬菜之家，台灣彰化縣)、珍珠石 (蔬菜之家，台灣彰化縣)，以 3：1：1 比例混合，高壓蒸氣消毒鍋 (宏霖儀器有限公司，台灣新北市) 121℃、1.5 kg cm^{-2} 滅菌 20 min。植株生長至 28 d 即可進行接種，試驗期間 7 d 施花寶 2 號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。青枯病菌使用 CPG 液態培養基，培養於 28℃ 2 d，配成懸浮液 (0.3 OD_{600}) 澆灌接種 150 mL (7 吋盆)，5 株為一組。於 15 d 內每天觀察植物萎凋情況 (葉片全數萎凋或全株死亡皆計為植株死亡)，存活植物數越少，代表此青枯病菌毒力較強 (Phukan *et al*. 2019)，並利用 log-rank test 進行統計分析。

Ba01 施用對感染植株之 ROS 累積情況

此試驗採用兩種染色方法觀察 ROS 累積情形，diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) 與 2’,7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA, Biotium, Fremont, CA, USA)。於 DAB 染色試驗中，28 d 大的馬鈴薯植株分別以 150 mL (0.3 OD_{600}) 的 RSN439 細菌懸浮液和 150 mL (1.0 OD_{600}) 的 Ba01、PMB01 或其混合液，並以 150 mL (1.0 OD_{600}) 的液化澱粉芽孢桿菌 PMB05 (Wang *et al*. 2019; Ho *et al*. 2020) 作為正對照組，每組 3 株 (介質體積為 7 吋盆 8 分滿)。試驗期間 7 d 施花寶 2 號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。土壤澆灌 24 min 後，剪取植株上位葉 (頂芽下方 3 個枝條的末端葉片) 浸泡於含有 0.1% DAB 之燒杯，於避光環境中，利用氣壓為 100 kPa 之 Rocker 400 無油式真空幫浦 (洛恩科技，台灣高雄市) 真空抽氣 15 min。取出後，讓葉片繼續浸泡於 DAB 溶液 24 h，於隔天使用 75% 酒精含 25% 醋酸去除葉綠素 (以隔水加熱方法，將葉片和酒精混合液之燒杯放入 50℃的水浴槽，待其葉綠素褪去)，葉片之褐色色素代表 ROS 累積。另，為瞭解 Ba01、PMB01 及 RSN439 共同處理是否可以在葉肉細胞較快速產生 ROS，將培養的 RSN439、Ba01、PMB01 分別稀釋成 OD_{600} 為 0.3、1.0、1.0 的細菌懸浮液。以 1：1 製備拮抗菌與病原菌混合液，利用一次性注射器 (Terumo, Tokyo, Japan) 進行葉片滲透接

種，並以 0.1 mL (1 OD_{600}) 的 PMB05 作為正對照組。3 h 後，將注射的葉片取下，浸泡於 75% 酒精含 25% 醋酸的混合液於 50℃的水浴槽去除葉綠素，再以 phosphate buffered saline (PBS, pH = 7) 漂洗葉片至無味，最後將葉片浸泡於含有 20 μM H_2DCFDA 和 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) 的 PBS，在避光情況下真空抽氣 15 min，後繼續避光一晚 (Zeng *et al*. 2015; Farzand *et al*. 2019)。使用 PBS 漂洗 2 次後將葉片移至螢光顯微鏡 Olympus BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) 觀察。採用濾鏡 excitation/emission: 460–495 nm/470–495 nm (Lumencor, Beaverton, OR, USA)。

Ba01 防治馬鈴薯青枯病之盆栽試驗

PMB01 為番茄青枯病與萎凋病唯一核准之生物農藥，但對於馬鈴薯青枯病之防治仍未有相關研究，因此以 PMB01 為對照菌株，測試 Ba01 是否具防治馬鈴薯青枯病之潛力。2 次生物性重複，每次重複每組分別為 4 與 5 植株 (介質體積為 7 吋盆 8 分滿)，分組如下：(1) 只澆灌水；(2) 只接種 RSN439 (150 mL、0.3 OD_{600})；(3) 只澆灌 Ba01 (150 mL、1.0 OD_{600})；(4) 只澆灌 PMB01 (150 mL、1.0 OD_{600})；(5) 同時澆灌 RSN439 (150 mL、0.3 OD_{600}) 和 Ba01 (150 mL、1.0 OD_{600})；及 (6) 同時澆灌 RSN439 (150 mL、0.3 OD_{600}) 和 PMB01 (150 mL、1.0 OD_{600})。馬鈴薯種植 28 d 後，進行 150 mL (0.3 OD_{600}) RSN439 接種，並同時澆灌 Ba01 或 PMB01 (150 mL、1.0 OD_{600})。試驗期間 7 d 施花寶2號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。試驗自接種馬鈴薯青枯病菌 RSN439 後，持續進行 14 d，以萎凋罹病指數 (disease index) (0 = 沒有病徵、1 = 0–25% 萎凋、2 = 26–50% 萎凋、3 = 51–75% 萎凋、4 = 76–99% 萎凋、5 = 植株死亡) 與萎凋罹病度 (wilt severity)：Σ (植株數量 × 萎凋罹病級數)/(植株總數量 × 最高萎凋罹病級數) × 100% 計算 (Chamedjeu *et al*. 2019)。

結果

馬鈴薯青枯病菌之鑑定

病原菌經分離培養於 TTC 鑑別性培養基 2–3 d 後，出現流質狀不規則圓形或橢圓形，中間呈粉紅色，外圍為乳白色之典型青枯病菌菌落型態。利用青枯病菌專一性引子 AU759/760 (Tran *et al*. 2016; Tsai *et al*. 2017) 對保守性 *IpxC* 基因序列進行增幅，4 株病菌皆可增幅 282 bp 的條帶 (圖 1A)，確定此 4 株為青枯病菌。另，利用鑑定青枯病菌 race 1 專一性引子 PS-IS-F/R (Jaunet & Wang 1999; Lee *et al*. 2001) 對4株馬鈴薯青枯病菌 insertion sequence IS1405 進行增幅，發現僅 RSN371 菌株產生預期 1,070 bp 的條帶，而 RSN245、

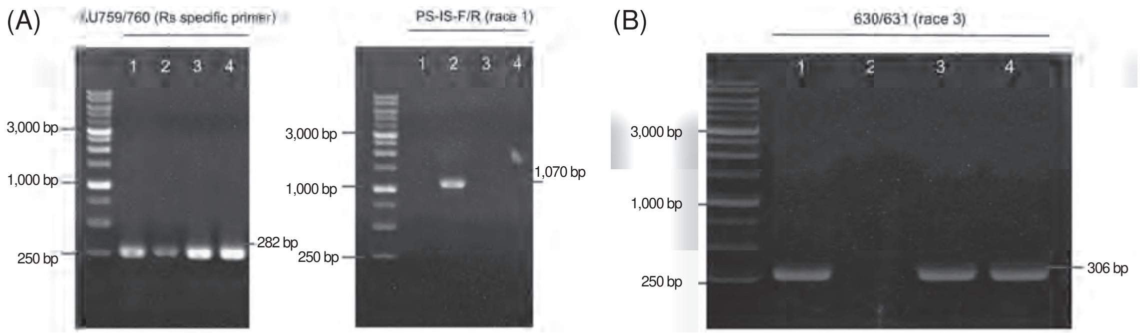

圖 1. 馬鈴薯青枯病菌之鑑定。(A) 分別利用青枯病菌專一性引子 AU759/760 與 race 1 專一性引子 PS-IS-F/R 於膠片上增幅 282 與 1,070 bp 大小的條帶；(B) 利用 race 3 專一性引子 630/631 於膠片上增幅 306 bp 大小的條帶。 (1 = RSN245; 2 = RSN371; 3 = RSN373; 4 = RSN439)

Fig. 1. Identification of *Ralstonia solanacearum* isolates. (A) The DNA fragments 282 and 1,070 bp of *R. solanacearum* were amplified by *R. solanacearum* specific primer pair AU759/760 and its race 1 specific primer pair PS-IS-F/R, respectively; and (B) the DNA fragment 306 bp was amplified by *R. solanacearum* race 3 specific primer pair 630/631. (1 = RSN245; 2 = RSN371; 3 = RSN373; 4 = RSN439)

RSN373 和 RSN439 菌株則無此條帶 (圖 1A)。而利用 630/631 (Kubota *et al*. 2011) 引子對 (增幅區域為 prophage gene RRSL_02400) 鑑別 race 3 之增幅結果發現 RSN245、RSN373 和 RSN439 菌株產生 306 bp 的條帶 (圖 1B)，而 RSN371 則無此條帶。由以上結果推論，馬鈴薯青枯病菌 RSN371 為 race 1，而 RSN245、RSN373 與 RSN439 則為 race 3。

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 具分泌胞外水解酶及溶磷能力

將 Ba01 和 PMB01 分別培養於鑑別蛋白質酶、澱粉酶、纖維素酶、脂質酶及溶磷能力培養基，發現 Ba01 與 PMB01 皆具分泌蛋白質酶、澱粉酶、纖維素酶、脂質酶及具溶磷能力 (圖 2A)。在澱粉酶與溶磷能力方面，Ba01 與 PMB01 產生的透化圈大小無差異，而在蛋白質酶與纖維素酶的分泌能力上，Ba01 有較強的能力 (unpaired *t*-test, *P*-value 分別為 0.0025、0.023) (圖 2B)。另外，脂質酶分泌的關鍵，為其是否會在培養基上產生沉澱，Ba01 和 PMB01 皆觀察到沉澱產生 (圖 2A)，說明 Ba01 與 PMB01 皆具脂質分解能力，但無法定量比較。

Ba01 具抑制馬鈴薯青枯病菌之能力

在濾紙片擴散試驗中，Ba01、PMB01 皆可有效抑制馬鈴薯青枯病菌 RSN373 與 RSN439，而對於 RSN245 與 RSN371 則產生較小抑制圈 (圖 3A)。經過 unpaired *t*-test 統計，Ba01 抑制 4 株青枯病菌的效果與 PMB01 相比具顯著性差異 (表 2)。另，為測試液化澱粉芽孢桿菌濾液是否具抑制青枯病菌之能力，在經過 28℃培養 2 d 後，取 100 μL 濾液塗盤進行計量。生長於 70% CPG 液態培養基的 RSN439 菌落數為 6.9×10^{10} cfu mL^{-1}，而經 Ba01 或 PMB01 濾液和 RSN439 細菌懸浮液共同培養後，Ba01 濾液可將 RSN439 之菌量降至 6.47×10^{10} cfu $mL^{-1} \pm 1.36 \times 10^{10}$ cfu mL^{-1}，而 PMB01 濾液則可將 RSN439 之菌量降至 2.35×10^{10} cfu $mL^{-1} \pm 0.67 \times 10^{10}$ cfu mL^{-1}。此試驗結果顯示，液化澱粉芽孢桿菌可能會分泌一些具有抑制馬鈴薯青枯病菌生長之二次代謝物於培養液中。透過 unpaired *t*-test 進行分析，Ba01 與 PMB01 濾液針對青枯病菌並無顯著之抑菌效果，但 PMB01 濾液的抑制效果較 Ba01 佳 ($P = 0.0092$) (圖 3B)。

在泳動能力測試方面，於 0.3% LB 培養基培養 8 h 後，Ba01 所產生之菌落平均直徑為 66.78 mm ± 2.41 mm，而 PMB01 的菌落平均直徑則為 40.87 mm ± 3.31mm，與 PMB01 相比，Ba01 具較佳的泳動能力 ($P < 0.0001$) (圖 3C)。而表面移行的能力測試方面，於 0.7% LB 培養基培養 8 h 後，發現 Ba01 (菌落平均直徑為 59.26 mm ± 6.53 mm) 相較於 PMB01 (32.72 mm ± 2.64 mm) 具較佳表面移行能力 ($P < 0.0001$) (圖 3C)。

Ba01 與 PMB01 對馬鈴薯青枯病菌之抑制無加乘作用

芽孢桿菌具防治多種植物病害之效果，而每株芽孢桿菌的抑菌機制有些許差異，因此欲探討混合液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 是否具提升抑制馬鈴薯青枯病菌之能力。Ba01、PMB01 或其混合液於塗有馬鈴薯青枯病菌 RSN245、RSN371、RSN373 或 RSN439 的 LB 固態培養基出現大小相似的抑制圈 (圖 4A)，經統計分析 Ba01 或 PMB01 與混合液之抑制圈，並無顯著性差異 (表 3)。此結果顯示，Ba01 與 PMB01 混合施用對於馬鈴薯青枯病菌並無加乘之抑制能力。由圖 4B 可見，培養 6 h 後，Ba01 之 OD_{600} 接近 2，較 PMB01 高。到第 24 h，Ba01 之 OD_{600} 已接近 5，為 PMB01 的 2 倍 (圖 4B)。結果顯示，Ba01 在 LB 液態培養基的生長速度較 PMB01 快 (圖 4B)。

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01、PMB01 形成生物膜之能力無顯著差異

生物膜的生成與液化澱粉芽孢桿菌纏聚於植物根部以保護植物免受病原菌之侵入感染，因此透過 crystal violet biofilm assay 來檢測 Ba01 與 PMB01 2 株液化澱粉芽孢桿菌之間的生物膜生合成能力。檢測結果，以 Ba01 的生物膜形成率設為 100%，而 PMB01 的生物膜生成百分比則為 99%，二者之間並無顯著性差異 (圖 5A)。另，為探討細菌之生長速率與生物膜生成之間的關係，進行細菌在 12 孔盤中培

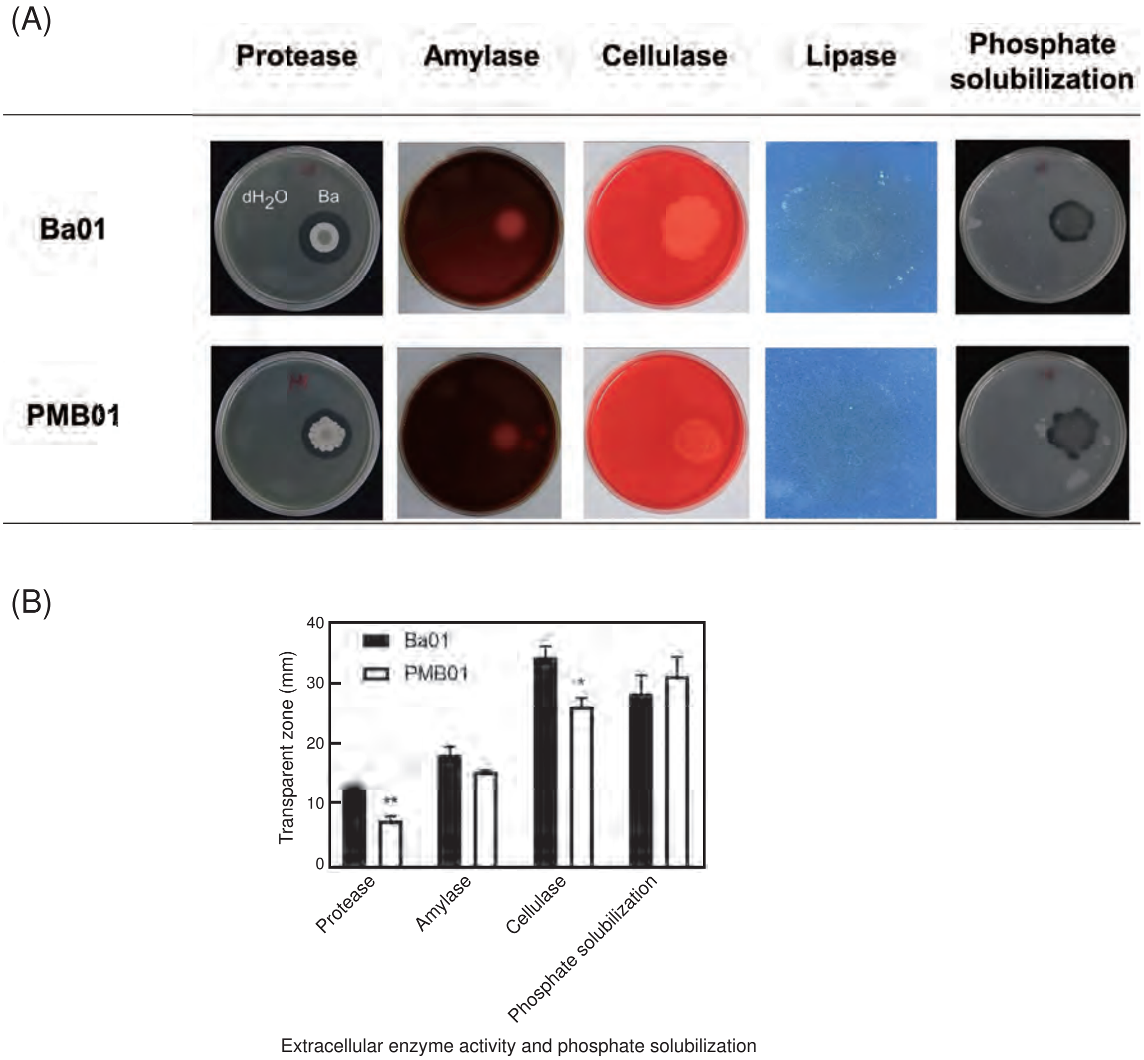

圖 2. 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 胞外水解酶與溶磷能力分析。(A) 胞外水解酶活性與溶磷能力之測試，每組技術性 3 重複。(B) Ba01 與 PMB01 於培養基上產生透化圈大小之比較。Ba01 蛋白酶與纖維素酶活性較 PMB01 強。統計使用 unpaired *t*-test (Prism 8.0.2)；* 代表 $P < 0.05$，** 代表 $P < 0.01$。

Fig. 2. Analysis of extracellular enzyme activity and phosphate solubilization in *Bacillus amyloliquefaciens*. (A) The assays of extracellular enzyme activity and phosphate solubilization were performed with agar plates containing specific substrates, and each assay included 3 technical replicates; (B) The comparison of transparent zones on medium produced by Ba01 and PMB01. *B. amyloliquefaciens* Ba01 has better ability to secret protease and cellulase compared to that of PMB01. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test; * and ** represent $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

養 48 h 後的生長曲線數據。兩細菌以同樣條件靜置培養於 12 孔盤中培養。測定結果發現，Ba01 於 LB 液態培養基生長 48 h 後的菌量約為 PMB01 的 1.6 倍 ($P < 0.0001$, *t*-test)，顯示 Ba01 於 12 孔盤靜置培養 48 h 後的生長速率較 PMB01 快 (圖 5B)。

青枯病菌 RSN439 對馬鈴薯具較強毒力

馬鈴薯植株接種青枯病菌 RSN439 後 15 d，全部出現萎凋病徵 (圖 6A)。而各青枯病菌菌株接種馬鈴薯後之病徵進展，如下所述。接種 RSN439 或 RSN373 的馬鈴薯於 9 d 後，開

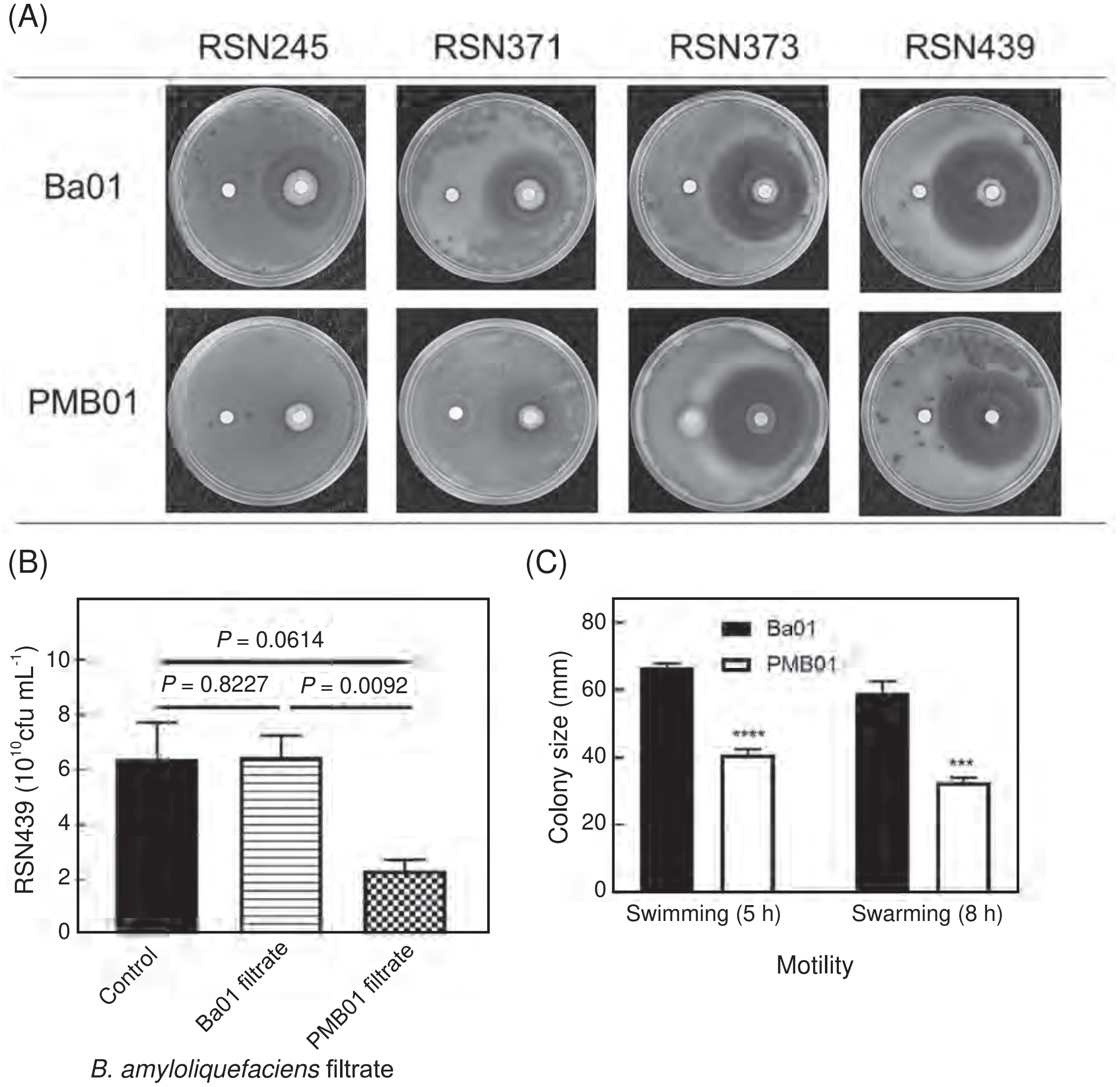

圖 3.　液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 具抑制青枯病菌之能力。 (A) 馬鈴薯青枯病菌懸浮液 (1.0 OD_{600}；RSN245、RSN371 體積為 100 μL，RSN373、RSN439 體積為 200 μL) 塗抹於 casamino acid peptone glucose (CPG) 固態培養基上，待風乾後，分別將 3 μL dH_2O 和 3 μL Ba01 (1.0 OD_{600}) 或 3 μLPMB01 (1.0 OD_{600}) 滴定於左、右濾紙片上；(B) Ba01 與 PMB01 培養濾液拮抗 RSN439 之後菌量總計。Ba01 濾液無法有效抑制 RSN439 的生長。RSN439 菌液 (1.0 OD_{600})：液化澱粉芽苞桿菌 Ba01 或 PMB01 濾液：CPG 培養基 = 1 : 2 : 7 之比例配置成 3 mL 之培養液，於 28℃培養 2 d 後，進行 RSN439 菌落數計算。70% CPG 培養基作為對照組；(C) Ba01 與 PMB01 於泳動及表面移行測試培養基上之菌落大小統計。相較 PMB01，Ba01 有較強的表面移行與泳動能力，統計使用 *t*-test 並與處理組 Ba01 比較；*** 代表 $P < 0.001$，**** 代表 $P < 0.0001$。

Fig. 3.　*Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 inhibited the growth of *Ralstonia solanacearum*. (A) 100 μL of *R. solanacearum* RSN245 or RSN371 and 200 μL of RSN373 or RSN439 (1.0 OD_{600}) were spread on CPG solid medium, while 3 μL of dH_2O and 3 μL Ba01 (1.0 OD_{600}) or 3 μL PMB01 (1.0 OD_{600}) were dropped on left and right filter paper, respectively; (B) the bacterial counts of RSN439 after incubation with Ba01 or PMB01 filtrate. Both Ba01 and PMB01 filtrates cannot inhibit the growth of RSN439. The 3 mL of broth were mixed with 1 : 2 : 7 ratio [1.0 OD_{600} *R. solanacearum* suspension : filtrate of *B. amyloliquefaciens* (Ba01 or PMB01) : CPG broth] and incubated at 28℃ for 2 d. 70% CPG broth was used as a control, and *P*-values were calculated using unpaired *t*-test with Prism 8.0.2; and (C) *B. amyloliquefaciens* Ba01 has better swimming and swarming ability than that of PMB01. *P*-values were calculated using *t*-test; *** and **** represent $P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively; each assay included 3 technical replicates.

表 2. 相較 PMB01，Ba01 抑制馬鈴薯青枯病菌能力較佳。統計使用 *t*-test，每組技術性 3 重複。

Table 2. Ba01 possessed better antibacterial activity against *R. solanacearum* compared to that of PMB01. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test[z].

Rs	Ba01 (mm)	PMB01 (mm)	*P*-value
RSN245	31.08 ± 3.64	21.77 ± 1.31	0.0140
RSN371	28.33 ± 6.76	11.05 ± 0.40	0.0115
RSN373	43.46 ± 0.80	38.64 ± 1.99	0.0177
RSN439	46.44 ± 1.06	38.55 ± 2.11	0.0044

[z] Rs = *Ralstonia solanacearum*. The unit of inhibition zone diameter: mm.

始出現典型青枯病的萎凋病徵。接種 RSN371 的馬鈴薯，則是 12 d 後開始出現萎凋病徵；而接種 RSN245 的馬鈴薯，亦於第 12 天出現第 1 株萎凋 (圖 6B)。透過 log-rank test 進行統計分析，RSN439 分別與 RSN245、RSN371 和 RSN373 比較之 *P*-value 為 0.018、0.040 及 0.013，且 RSN439 的致死率最高，故青枯病菌 RSN439 對馬鈴薯之毒力較其他菌株強，因而後續的盆栽試驗皆使用 RSN439 進行試驗。

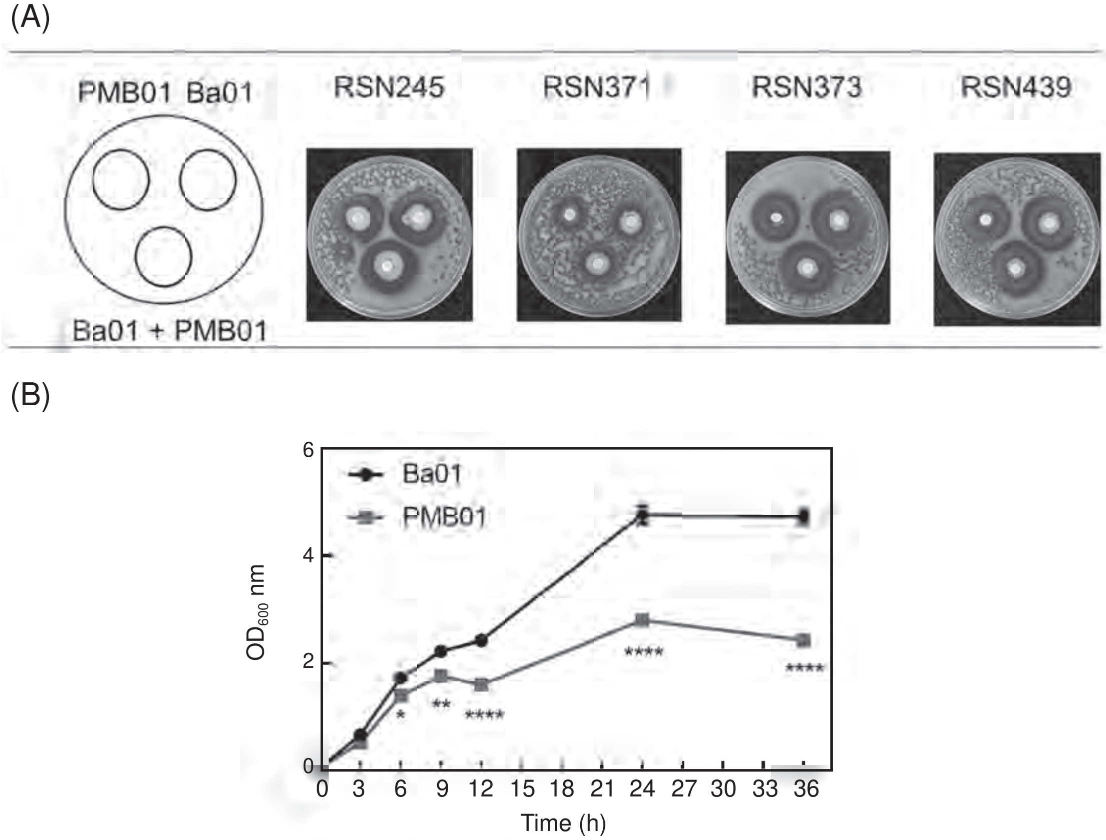

圖 4. Ba01 與 PMB01 混合液對馬鈴薯青枯病菌無加乘抑制作用。(A) 將 200 µL (1.0 OD_{600}) 的馬鈴薯青枯病菌 RSN439 懸浮液均勻塗盤於 casamino acid peptone glucose (CPG) 培養基，培養於 28℃。濾紙片分別滴上 3 µL Ba01、PMB01 (1.0 OD_{600}) 或其混合液；(B) 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 於 Luria-Bertani (LB) 液態培養基的生長速率 (以 OD_{600} 表示)。培養於 37℃，轉速 10.73× *g*；* 代表 $P < 0.05$，** 代表 $P < 0.01$，**** 代表 $P < 0.0001$。

Fig. 4. The combination of Ba01 and PMB01 has no synergistic effect on inhibiting the growth of *Ralstonia solanacearum* RSN439. (A) The 200 µL (1.0 OD_{600}) of *R. solanacearum* RSN439 suspension were spread on CPG solid medium, and 3 µL of Ba01, PMB01 (1.0 OD_{600}) or Ba01/PMB01 mixed suspension were dropped on filter papers. Plates were incubated at 28℃ for 24 h; and (B) the growth rate of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 (expressed in OD_{600}) at 37℃ with shaking 10.73× *g*; *, ** and **** represent $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively.

表 3. 共同使用 Ba01 與 PMB01 對 RSN439 無加乘抑制作用，統計使用 *t*-test，並比較混合液處理與單獨處理之具顯著性差異。

Table 3. Clear zones were measured after incubation, and *P*-values were calculated using unpaired t-test.

Inhibition zone (mm)	RSN245	RSN371	RSN373	RSN439
Ba01	15.26 ± 0.46	10.30 ± 0.69	16.43 ± 1.13	16.16 ± 0.42
PMB01	14.18 ± 0.24	11.11 ± 0.89	13.75 ± 0.73	15.41 ± 0.44
Ba01 + PMB01	15.41 ± 1.27	10.57 ± 0.92	16.99 ± 0.75	16.05 ± 0.30
Ba01 v.s. Ba01 + PMB01 (*P*-value)	0.8568	0.7051	0.5140	0.7238
PMB01 v.s. Ba01 + PMB01 (*P*-value)	0.1746	0.5055	0.0058	0.1070

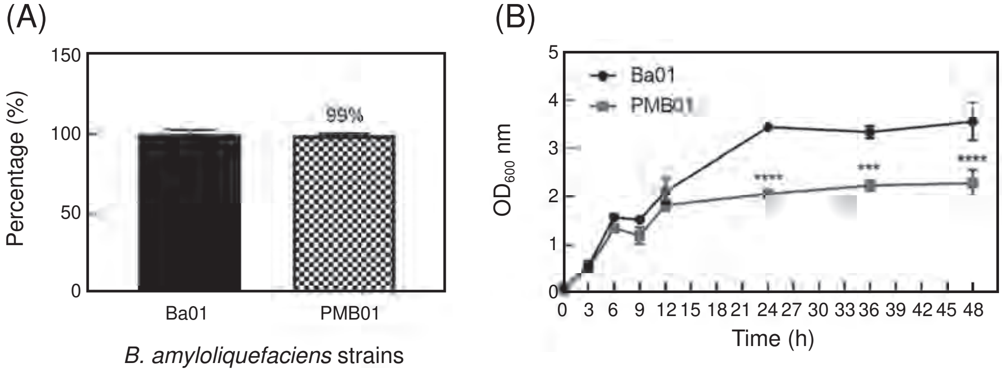

圖 5. 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 生物膜生成能力與靜置培養之生長速率。(A) Ba01 和 PMB01 產生生物膜的能力相當；(B) Ba01 與 PMB01 於 Luria-Bertani (LB) 液態培養基之生長速率 (以 OD_{600} 表示)。靜置培養於 12 孔盤中，溫度為 37℃；*** 代表 $P < 0.001$，**** 代表 $P < 0.0001$。

Fig. 5. Biofilm formation ability and growth rate of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01. (A) *B. amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 have similar level of biofilm formation ability in LB liquid medium; and (B) the growth rate of *B. amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 (expressed in OD_{600}) in 12-well plates at 37℃ without shaking; *** and **** represent $P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively.

Ba01 在接種青枯病菌情況下能誘導植物產生抗病反應

為觀察植物接種後 ROS 累積情形，試驗使用 DAB 與 H_2DCFDA 進行染色。植物細胞被病原侵入後會產生過氧化物等活性氧，DAB 經過氧化物氧化後，會產生褐色的沉澱；H_2DCFDA 屬細胞滲透螢光探針，進入細胞後被細胞酯酶修飾形成非螢光的 H_2DCF，在細胞被病原侵入後，H_2DCF 會被活性氧氧化產生高強度螢光物質。在接種青枯病菌、液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 懸浮液 24 h 後，以 DAB 染色一晚後觀察葉片 ROS 累積所產生的褐色沉澱。液化澱粉芽孢桿菌 PMB05 已被證實於 PAMP 存在下可誘導阿拉伯芥產生 ROS 累積 (Wang *et al*. 2019)，而在馬鈴薯單獨接種 PMB05 之正對照組葉片幾乎 100% 呈現褐色沉澱，而單獨接種 Ba01 或 PMB01 之葉片則無褐色沉澱產生 (圖 6A)。然而，經馬鈴薯青枯病菌 RSN439 處理之植株可觀察到葉片近葉柄的葉肉部分，呈現約 70% 褐色沉澱，而在葉尖則未發現此褐色沉澱。而觀察分別經 RSN439 + Ba01 或 RSN439 + PMB01 同時處理之葉片，可發現兩處理組的葉片，其褐色沉澱覆蓋率接近 100% (圖 7A)。另外，以 H_2DCFDA 染色法進一步分析 Ba01 與 PMB01 可否於青枯病菌 RSN439 接種 3 h 後增加 ROS 的產生。由結果可見，Ba01 與 PMB01 在青枯病菌 RSN439 存在下能快速累積螢光訊號 (圖 7B)，顯示 Ba01 與 PMB01 接種於感染青枯病菌植株具備能誘導馬鈴薯植株產生抗病能力之潛能。

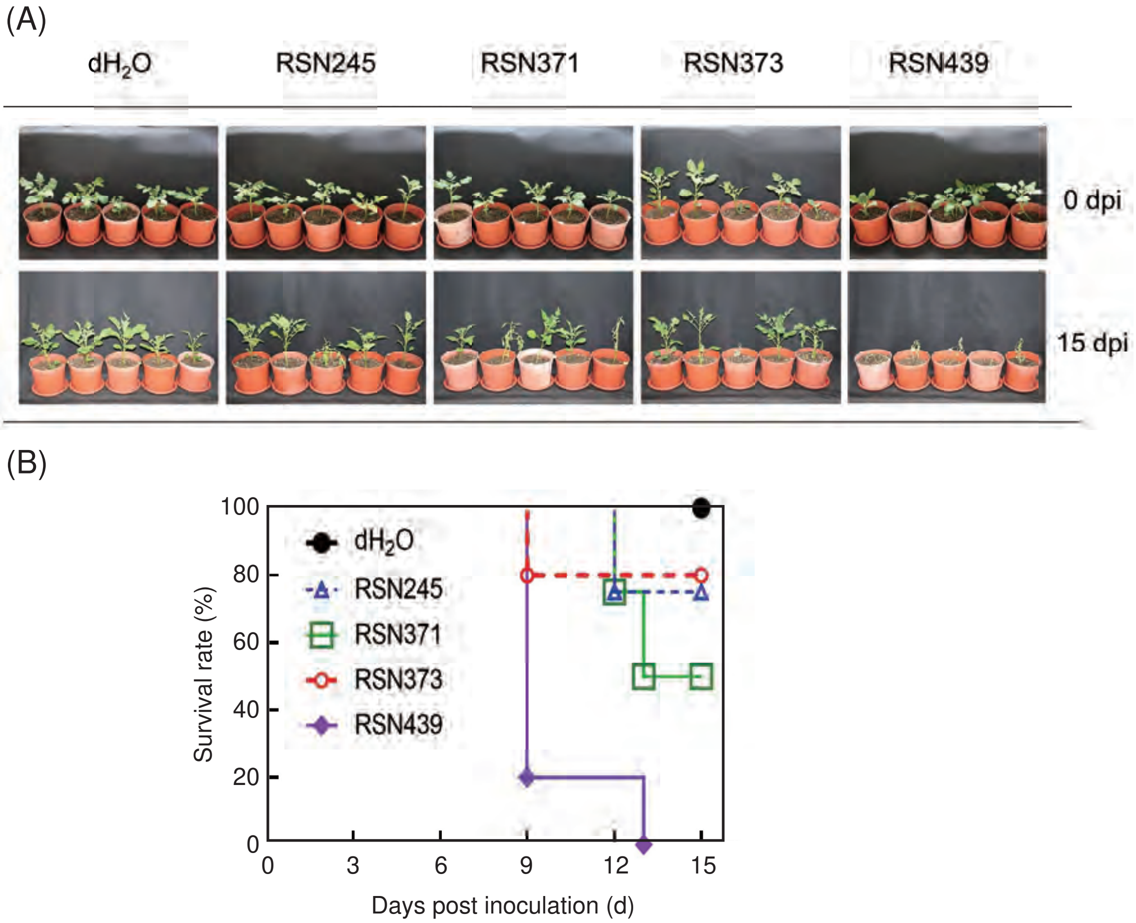

圖 6. 馬鈴薯青枯病菌 RSN439 具較強毒力。(A) 馬鈴薯青枯病菌接種 15 d 後的病徵。馬鈴薯青枯病菌接種濃度與體積為 0.3 OD_{600}、150 mL，每試驗組 5 棵植株；(B) 使用 Prism 8.0.2 進行存活率製圖，從接種的第一天記為 Day 0，並於接種後每天紀錄，共觀察 15 d。

Fig. 6. Potato bacterial wilt pathogen RSN439 has stronger virulence. (A) The symptoms of potato plants infected by one of four *Ralstonia solanacearum* isolates shown at 15 dpi. Potato plants were inoculated with 150 mL *R. solanacearum* (0.3 OD_{600}). Each treatment included 5 potato plants; and (B) survival curves of potato plants after inoculation were graphed by Prism 8.0.2. (dpi: day-post-infection)

Ba01 具防治馬鈴薯青枯病之能力

試驗處理組含對照組共 6 組，2 次生物性重複，每次重複每組分別為 4 與 5 植株。結果顯示，只接種馬鈴薯青枯病菌 RSN439 的馬鈴薯植株，14 d 後，其罹病度 (disease severity) 為 95% ± 13.2%；而澆灌 Ba01 或 PMB01 的馬鈴薯植株則無病徵 (圖 8A)。而同時澆灌 RSN439 和 Ba01 後的處理組，其罹病度降至 20% ± 32.6% (*t*-test，$P < 0.0001$，與僅接種 RSN439 之處理組相比)，而同時澆灌 RSN439 和 PMB01 的處理組，其罹病度降至 33.3% ± 41.1% (*t*-test，$P = 0.0006$，與僅接種 RSN439 之處理組相比) (圖 8B)。此試驗結果顯示，Ba01 與 PMB01 皆能有效降低馬鈴薯青枯病之罹病度。然而青枯病菌感染植株經過 Ba01 或 PMB01 處理，青枯病的罹病度於兩者之間並無顯著性差異 (圖 7B)。

討論

芽孢桿菌長期以來已被使用於各種植物病

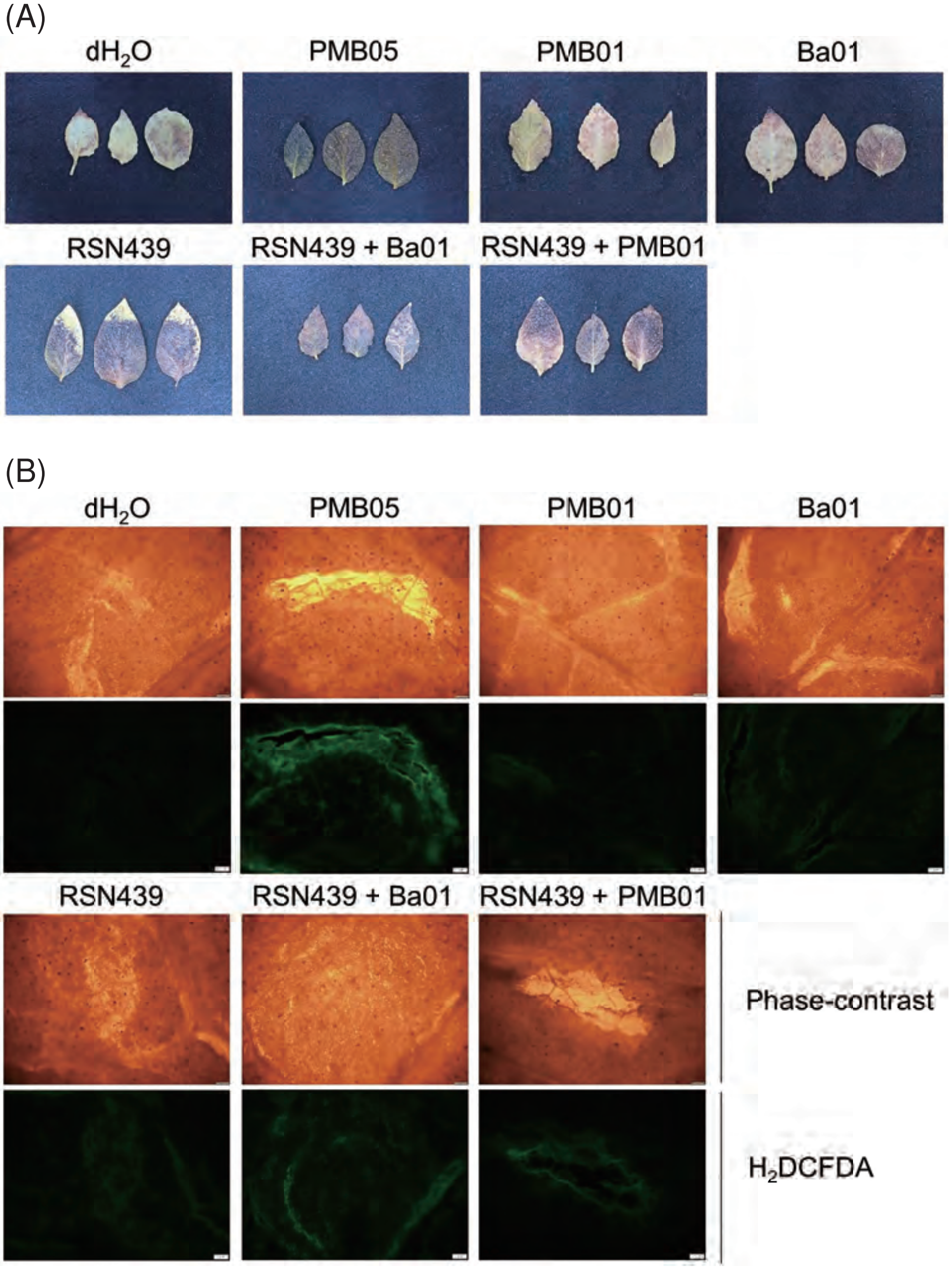

圖 7.　Ba01 或 PMB01 與馬鈴薯青枯病菌 RSN439 共同施用能增加植物葉片內 reactive oxygen species (ROS) 的累積。(A) 液化澱粉芽孢桿菌 (1.0 OD_{600}) 和馬鈴薯青枯病菌 (0.3 OD_{600}) 單獨或混合以土壤澆灌 150 mL，24 h 後，利用二氨基聯苯胺 (DAB) 染色，並放置隔夜進行觀察；(B) 液化澱粉芽孢桿菌 (1.0 OD_{600}) 和馬鈴薯青枯病菌 RSN439 (0.3 OD_{600}) 以針筒接種 0.1 µL，3 h 後，利用 H_2DCFDA 染色並放置隔夜。使用螢光顯微鏡 Olympus BX53。比例尺代表 200 µm。

Fig. 7.　ROS accumulation was increased in potato leaves after inoculation with *Ralstonia solanacearum* RSN439 simultaneously with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 or PMB01. (A) Potato leaves were dyed with diaminobenzidine (DAB) after soil inoculation for 24 h with 150 mL of *B. amyloliquefaciens* and/or *R. solanacearum* RSN439, and laid overnight before observation; and (B) potato leaves were dyed with H_2DCFDA after syringe injection for 3 h with 0.1 µL of *B. amyloliquefaciens* and/or *R. solanacearum* RSN439, and laid overnight before observation. The samples were observed by fluorescence microscope Olympus BX53. The scale represents 200 µm.

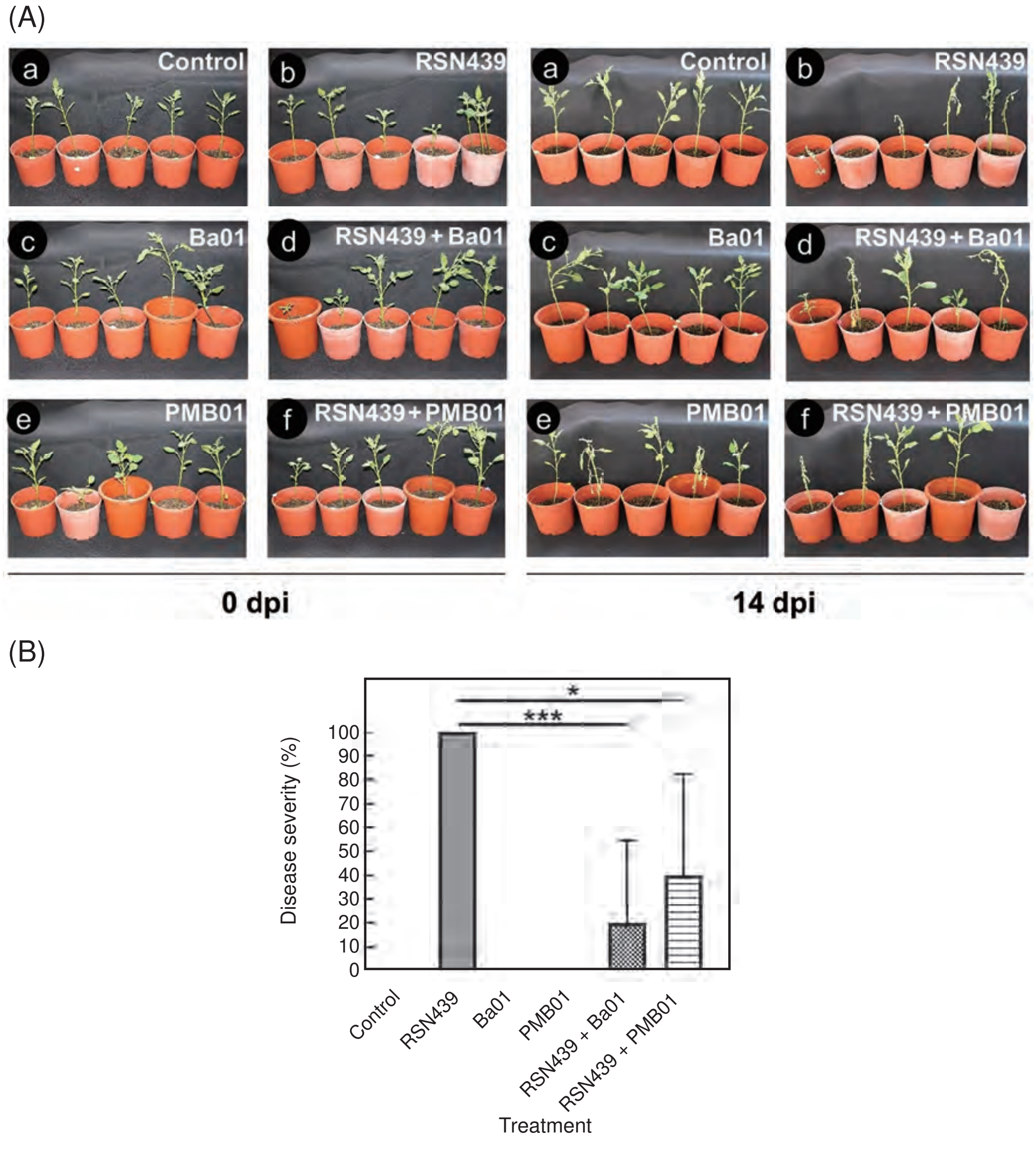

圖 8. Ba01 與 PMB01 皆能有效降低馬鈴薯青枯病之罹病度。(A) 共 6 處理組，進行 2 次生物性重複，每次每組分別為 4 與 5 植株 (以 5 植株之圖片為代表)：(a) 只澆灌水；(b) 只接種 RSN439；(c) 只澆灌 Ba01；(d) 同時澆灌 RSN439 和 Ba01；(e) 只澆灌 PMB01； (f) 同時澆灌 RSN439 和 PMB01。每盆澆灌 150 mL，Ba01 與 PMB01 濃度為 1.0 OD_{600}，RSN439 濃度為 0.3 OD_{600}。(B) 接種 14 d 後，馬鈴薯青枯病之罹病度統計圖。統計使用 9 株馬鈴薯植株的平均罹病度 ± 標準差，並以 *t*-test 與 RSN439 處理組比較。$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

Fig. 8. Applying Ba01 or PMB01 can effectively reduce the disease severity of potato bacterial wilt. (A) There were 6 treatments each with 2 biological repeats (4 and 5 potato plants). The figure with 5 potato plants was represented. (a) dH_2O (control); (b) RSN439 only; (c) Ba01 only; (d) RSN439 plus Ba01; (e) PMB01 only; and (f) RSN439 plus PMB01. For each pot, 150 mL of bacterial suspension as described were added, and the concentration of Ba01 or PMB01 was 1.0 OD_{600}, while RSN439 was 0.3 OD_{600}. (B) The disease severity of potato bacterial wilt after 14-day inoculation was expressed as the average ± standard deviation of 9 potato plants. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test and compared with RSN439 treatment. * represents $P < 0.05$, and *** represents $P < 0.001$. (dpi: day-post-infection)

蟲害之防治，其中液化澱粉芽孢桿菌是常使用的生物防治菌。液化澱粉芽孢桿菌於 1943 年由日本學者 Fukomoto 第一次發現，其可分泌澱粉酶、蛋白酶及多種抑菌物質。而溶磷或產生植物激素，如吲哚乙酸之能力，也使其被用作生物肥料 (Yuan *et al*. 2013)。台灣亦有許多已上市之液化澱粉芽孢桿菌產品：如 Ba-BPD1 (活力磷寶，台灣肥料，台灣台北市) 為生物肥料，具溶磷能力，亦可用來防治水稻紋枯病 (Liao 2017)；PMB01 (救你一命，絕症剋星，嘉農，台灣新竹市) 為生物農藥，主要防治番茄青枯病 (Chou *et al*. 2013)。Ba01 由馬鈴薯薯皮所分離，並由前人發現其對馬鈴薯瘡痂病具防治效果 (Lin *et al*. 2018)，且能分泌環脂肽類二次代謝物，包括伊枯草菌素 (iturin)、表面素 (surfactin) 及豐原素 (fengycin) (Lee *et al*. 2001) 等抑菌物質。本研究透過對峙培養與濾紙片擴散法等試驗發現 Ba01 亦具有抑制馬鈴薯青枯病菌的能力，其效果不亞於核准藥劑 PMB01。推測 Ba01 可透過產生二次代謝物防治馬鈴薯青枯病，未來可使用二次代謝物合成相關基因之突變株進行盆栽試驗加以證明。

微生物會分泌不同的分解酶以利外來養分之吸收，其中水解酶可分解多種大分子化合物，包括蛋白質、澱粉、纖維素、脂質、半纖維素與幾丁質等，例如 *Serratia marcescens* 防治豆科白絹病的能力與幾丁質酶表現有關；而 ß-1,3-glucanase 的分泌能有效增強 *Lysobacter enzymogenes* C3 對高狐草葉斑病與甜菜猝倒病的生物防治能力 (Ordentlich *et al*. 1988; Palumbo *et al*. 2005)。這些酵素會分解植物殘體和非生物的有機物提供植物吸收，間接促進植物防禦能力 (Jadhav *et al*. 2017)。本試驗利用不同基質的培養基測試，發現 Ba01 與 PMB01 皆有分解蛋白質、澱粉、脂質及纖維素之能力 (圖 2)，且 Ba01 在分泌蛋白酶與纖維素酶之能力較 PMB01 大，這些分解酶可能會干擾病原菌的生長，例如蛋白酶和脂質分解酶可降解並破壞病原菌細胞壁，並與表面素的產生和表面移行能力有關 (Connelly *et al*. 2004)；而 α-澱粉酶可將糖殘基 (sugar residues) 分解供植物生長，另經過降解病原菌生物膜結構以達到抑制病原菌生長之目的 (Compaoré *et al*. 2013)。

除了表面移行能力，泳動能力亦會影響生物膜的形成，且芽孢桿菌的表面移行與泳動能力越強，其生物膜產生的能力越差 (Bartolini *et al*. 2019)，本研究發現 Ba01 的表面移行與泳動能力較 PMB01 佳 (圖 3C)，但兩者生物膜產生的量相當 (圖 5A)。後續 Ba01 與 PMB01 在 24 h 內的生長曲線發現，Ba01 生長速度亦較快 (圖 5B)。因此，試驗結果符合芽孢桿菌表面移行與泳動能力較佳之菌株 (如 Ba01)，其形成生物膜之量下降，然而因 Ba01 生長速度較快，最終與表面移行與泳動能力較弱之菌株 (如 PMB01) 達成相當的生物膜產生量。

除了上述的防治途徑外，Ba01 誘導馬鈴薯植株產生抗病反應，亦是防治馬鈴薯青枯病的可能途徑。前人研究發現，芽孢桿菌表面素可做為一種病原相關分子模型 (PAMP)，用以誘導菸草細胞活性氧 (ROS) 的產生，並增強植物抗病能力。因此，ROS 的累積也被視為誘發植物產生抗病反應的重要指標 (Zeriouh *et al*. 2014)。本研究發現，Ba01 與 PMB01 分別和馬鈴薯青枯病菌 RSN439 共同施用的情況下，相較於單獨施用 Ba01、PMB01 或 RSN439 之處理組，具有更多的 ROS 累積，與 Wang *et al*. (2019) 的研究中證明部分芽孢桿菌菌株具有提升 PTI 功能的研究相符。是否 Ba01 與 PMB01 也具有此功能，抑或是菌株本身即可引起 PTI，仍值得進一步研究；然而 Ba01 與 RSN439 共同施用的情況下，H_2DCFDA 染色後所產生的螢光訊號較 PMB01 和 RSN439 共同施用強。因此，推測 Ba01 於馬鈴薯青枯病菌存在時，其誘導植物產生抗病的能力比 PMB01 佳。在本文試驗中，PMB05 不需病原菌存在就可於馬鈴薯誘導 ROS 產生，但 Ba01 則需要病原菌存在。因此，顯示 PMB05 誘導 ROS 產生的機制可能與 Ba01 不同。PMB05 於 Ho *et al*. (2020) 之論文，發現 PMB05 需在 *Ralstonia solanacearum* 的 PopW (harpin) 作為 PAMP 的情況下，才能增強番茄透過鈣離子通道與 NADPH 氧化酶誘導 ROS 產生及抗病。而前人研究發現，Ba01 可透過分泌 surfactin 抑制馬鈴薯瘡痂病菌，且 *Bacillus* spp. 在病原菌同時存在的情況下，會比 *Bacillus* spp. 單獨培養分泌更多 surfactin。surfactin 作為 PAMP，亦可

誘導植物粒線體產生 ROS 的累積。因此，預測 surfactin 的分泌為 Ba01 誘導 ROS 累積的可能機制之一。

綜上所述，本研究發現 Ba01 可經由多種途徑直接或間接拮抗馬鈴薯青枯病菌，其機制可能與抑制病原菌生長、促進植物吸收營養與提升植物抗病能力有關，說明 Ba01 具防治馬鈴薯青枯病之潛力。

誌謝

感謝國立台灣大學陳昭瑩博士與林乃君博士提供試驗技術協助；農委會 (108 農科 -1.2.1-科-aI) 及科技部 (107-2320-B-002-061-MY3) 提供研究經費。

引用文獻

Algburi, A., S. A. Alazzawi, A. I. A. Al-Ezzy, R. Weeks, V. Chistyakov, and M. L. Chikindas. 2020. Potential probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 co-aggregate with clinical isolates of *Proteus mirabilis* and prevent biofilm formation. Probiotics & Antimicro. Prot. 12:1471–1483. doi:10.1007/s12602-020-09631-0

Almoneafy, A. A., K. U. Kakar, Z. Nawaz, B. Li, M. A. Saand, C. L. Yang, and G. L. Xie. 2014. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. Symbiosis 63:59–70. doi:10.1007/s13199-014-0288-9

Álvarez, B., E. G. Biosca, and M. M. López. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. p.267–279. *in*: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. (Mendez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center. Badaioz, Spain. 1620 pp.

Arguelles-Arias, A., M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris, and P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microb. Cell Fact. 8:63. doi:10.1186/1475-2859-8-63

Arrebola, E., D. Sivakumar, R. Bacigalupo, and L. Korsten. 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. Crop Prot. 29:369–377. doi:10.1016/j.cropro.2009.08.001

Bartolini, M., S. Cogliati, D. Vileta, C. Bauman, L. Rateni, C. Leñini, F. Argañaraz, M. Francisco, J. M. Villalba, L. Steil, U. Völker, and R. Grau. 2019. Regulation of biofilm aging and dispersal in *Bacillus subtilis* by the alternative sigma factor SigB. J. Bacteriol. 201:e00473-18. doi:10.1128/JB.00473-18

Bloemberg, G. V. and B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 4:343–350. doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7

Cao, Y., H. Pi, P. Chandrangsu, Y. Li, Y. Wang, H. Zhou, H. Xiong, J. D. Helmann, and Y. Cai. 2018. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. Sci. Rep. 8:4360. doi:10.1038/s41598-018-22782-z

Chamedjeu, R. R., J. Masanga, V. Matiru, and S. Runo. 2019. Potential use of soil bacteria associated with potato rhizosphere as bio-control agents for effective management of bacterial wilt disease. J. Microbiol. Res. 9:12–24. doi:10.5923/j.microbiology.20190901.03

Chang, J. J., P. Y. Wu, Y. N. Lin, W. L. Deng, and Y. H. Lin. 2019. Intensification of PAMP-triggered immunity in watermelon by *Bacillus* spp. strains as a strategy for controlling bacterial fruit blotch disease. J. Plant Med. 61(1):39–48. (in Chinese with English abstract) doi:10.6716/JPM.201903_61(1).0004

Chen, H. W., Y. H. Lin, J. W. Huang, and P. F. L. Chang. 2010. Effect of *Bacillus mycoides* on seedlings growth of lettuce. Plant Pathol. Bull. 19:157–165. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201006_19(2).0005

Chou, H. P., Y. C. Chen, and T. C. Huang. 2013. Application and evaluation of multiple microorganisms in controlling bacterial wilt of Solanaceous plants. Agric. News 84:24–25 (in Chinese)

Chowdhury, S. P., A. Hartmann, X. Gao, and R. Borriss. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42- A review. Front. Microbiol. 6:780. doi:10.3389/fmicb.2015.00780

Chuang, M. F., S. F. Lo, and C. Y. Lin. 2015. Effect of temperature on virulence of *Ralstonia solanacearum* biovars and response of potato cultivars (lines) to bacterial wilt. J. Taiwan Agric. Res. 64:89–98. (in Chinese with English abstract)

Ciampi, L. and L. Sequeira. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. Amer. Potato J. 57:307–317. doi:10.1007/BF02854025

Compaoré, C. S., D. S. Nielsen, L. I. I. Ouoba, T. S. Berner, K. F. Nielsen, H. Sawadogo-Lingani, B. Diawara, G. A. Ouédraogo, M. Jakobsen, and L. Thorsen. 2013. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*

H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. Intl. J. Food Microbiol. 162:297–307. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.013

Connelly, M. B., G. M. Young, and A. Sloma. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 186:4159–4167. doi:10.1128/JB.186.13.4159-4167.2004

Denny, T. P. 2007. Plant Pathogenic *Ralstonia* species. p.573–644. *in*: Plant-associated Bacteria. (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht, The Nederland. 712 pp.

Doke, N. 1985. NADPH-dependent O2-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. Physiol. Plant Pathol. 27:311–322. doi:10.1016/0048-4059(85)90044-X

Farzand, A., A. Moosa, M. Zubair, A. R. Khan, V. C. Massawe, H. A. S. Tahir, T. M. M. Sheikh, M. Ayaz, and X. Gao. 2019. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Biomolecules 9:613. doi:10.3390/biom9100613

Fegan, M., G. Holoway, A. Hayward, and J. Timmis. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. p.34–43. *in*: Bacterial Wilt Disease. (Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone, eds.) Springer. Berlin, Germany. 449 pp.

Haggag, W. M. and S. Timmusk. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. J. Appl. Microbiol. 104:961–969. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x

Ho, T. H., C. Y. Chuang, J. L. Zheng, H. H. Chen, Y. S. Liang, T. P. Huang, and Y. H. Lin. 2020. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato. Phytopathology 110:1877–1855. doi:10.1094/PHYTO-01-20-0026-R

Jadhav, H. P., S. S. Shaikh, and R. Z. Sayyed. 2017. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. p.183–203. *in*: Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. (Mehnaz, S., ed.) Springer. Singapore. 289 pp.

Jaunet, T. X. and J. F. Wang, 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 89:320–327. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.4.320

Kasana, R. C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, and A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram’s iodine. Curr. Microbiol. 57:503–507. doi:10.1007/s00284-008-9276-8

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693–695.

Kubota, R., M. A. Schell, G. D. Peckham, J. Rue, A. M. Alvarez, C. Allen, and D. M. Jenkins. 2011. In silico genomic subtraction guides development of highly accurate, DNA-based diagnostics for *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 and blood disease bacterium. J. Gen. Plant Pathol. 77:182–193. doi:10.1007/s10327-011-0305-2

Kuo, C. C., C. W. Chen, C. T. Liao, W. L. Chen, and Y. F. Tsai. 2014. Development and application of *Bacillus amyloliquefaciens* on plant diseases biocontrol. p.69–86. *in*: Proceedings of the Conference on the Development of Agricultural Biological Materials Industry. March 18, 2014. Taichung, Taiwan. Agric. Biol. Agents Dev. Soc. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Lee, Y. A., S. C. Fan, L. Y. Chiu, and K. C. Hsia. 2001. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterization and detection. Appl. Environ. Microbiol. 67:3943–3950. doi:10.1128/AEM.67.9.3943-3950.2001

Liao, J. H. 2017. Biocontrol of crop disease with *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 and its major antifungal lipopeptide. Master Thesis, Department of Chemical Engineering, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 88 pp. (in Chinese with English abstract)

Lin, C., C. H. Tsai, P. Y. Chen, C. Y. Wu, Y. L. Chang, Y. L. Yang, and Y. L. Chen. 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. PLoS One 13:e0196520. doi:10.1371/journal.pone.0196520

Lin, S. S. 2015. Application of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 to control bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas euvesicatoria* on sweet pepper. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pintung, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract) doi:10.6346/NPUST.2015.00029

Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, and F. Van Breusegem. 2011. ROS signaling: The new wave? Trends Plant Sci. 16:300–309.

doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007

Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5:19–30.

Ordentlich, A., Y. Elad, and I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 78:84–88.

Pal, K. K. and B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. Plant Health Instr. 2:1117–1142. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02

Palumbo, J. D., G. Y. Yuen, C. C. Jochum, K. Tatum, and D. Y. Kobayashi. 2005. Mutagenesis of β-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bipolaris leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. Phytopathology 95:701–707. doi:10.1094/PHYTO-95-0701

Peeters, N., A. Guidot, F. Vailleau, and M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Mol. Plant Pathol. 14:651–662. doi:10.1111/mpp.12038

Phukan, T., K. Kabyashree, R. Singh, P. L. Sharma, N. Singh, A. Barman, B. R. Jena, and S. K. Ray. 2019. *Ralstonia solanacearum* virulence in eggplant seedlings by the leaf-clip inoculation. Phytopathol. Res. 1:23. doi:10.1186/s42483-019-0030-x

Singh, D., D. K. Yadav, G. Chaudhary, V. S. Rana, and R. K. Sharma. 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. J. Plant Pathol. Microbiol. 7:1–6. doi:10.4172/2157-7471.1000327

Sonune, N. and A. Garode. 2018. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. Biotechnol. Res. Innov. 2:37–44. doi:10.1016/j.biori.2018.03.001

Tran, T. M., J. M. Jacobs, A. Huerta, A. Milling, J. Weibel, and C. Allen. 2016. Sensitive, secure detection of race 3 biovar 2 and native U.S. strains of *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 100:630–639. doi:10.1094/PDIS-12-14-1327-RE

Tsai, C. H., P. J. Ann, S. L. Hwang, Y. S. Lu, J. R. Li, and Z. Q. Hong. 2017. Occurrence of bacterial wilt on autumn maple tree. J. Taiwan Agric. Res. 66:44–52. (in Chinese with English abstract)

Villa, J., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N. Opina, and M. Hyakumachi. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282-bp PCR-amplified fragment. Plant Dis. 87:1337–1343. doi:10.1094/PDIS.2003.87.11.1337

Wang, Y. H., I. L. Lai, J. L. Zheng, and Y. H. Lin. 2019. Using dynamic changes of chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis thaliana* to evaluate plant immunity-intensifying *Bacillus* spp. strains. Phytopathology 109:1566–1576. doi:10.1094/PHYTO-02-19-0063-R

Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race 3/biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields in Dounan, Yunlin County. Plant Pathol. Bull. 20:68–77.

Wu, Y. M. 2016. Study of *Bacillus* spp. on the control of strawberry anthracnose and possible mechanisms involved. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. Taiwan. 61 pp. (in Chinese with English abstract)

Yuan, J., Y. Ruan, B. Wang, J. Zhang, R. Waseem, Q. Huang, and Q. Shen. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6-enriched bio-organic fertilizer suppressed *Fusarium wilt* and promoted the growth of banana plants. J. Agric. Food Chem. 61:3774–3780. doi:10.1021/jf400038z

Yuliar, Y. A. Nion, and K. Toyota. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes Environ. 30:1–11. doi:10.1264/jsme2.me14144

Zeng, L., J. Zhou, B. Li, and D. Xing. 2015. A high-sensitivity optical device for the early monitoring of plant pathogen attack via the *in vivo* detection of ROS bursts. Front. Plant Sci. 6:96. doi:10.3389/fpls.2015.00096

Zeriouh, H., A. de Vicente, A. Pérez-García, and D. Romero. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. Environ. Microbiol. 16:2196–2211. doi:10.1111/1462-2920.12271

Biological Control of Potato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01

Zen-Chi Huang[1], Ya-Fang Wu[2], Chia-Hsin Tsai[3], Hau-Ping Chou[4], Yi-Hsien Lin[5], and Ying-Lien Chen[6,*]

Abstract

Huang, Z. C., Y. F. Wu, C. H. Tsai, H. P. Chou, Y. H. Lin, and Y. L. Chen. 2021. Biological control of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):24–42.

Solanaceae bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* has been an important disease of potato and tomato. Though there were no recommended bactericides, current ways to control the bacterial wilt included using bacteria-free tubers, rotation with cereals or rice, and applying *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 as a biocontrol agent. *B. amyloliquefaciens* Ba01 was isolated from healthy potato tuber, and demonstrated the antibacterial effect against potato common scab. In this study, we found that *B. amyloliquefaciens* Ba01 effectively inhibited the growth of potato bacterial wilt pathogen *R. solanacearum*, and it can enhance phosphate solubilization and secrete multiple extracellular enzymes, such as protease, amylase, cellulase and lipase, which could facilitate the growth of plants. Meanwhile, Ba01 exerted better swimming/swarming ability compared to PMB01, indicating it might colonize well in potato plants. We also found that Ba01 had better ability in biofilm formation than PMB01. In terms of antibacterial activity, both Ba01 and PMB01 can inhibit *R. solanacearum* race 1 strain RSN371, and race 3 strains RSN245, RSN373 and RSN439, but there were no synergistic effect between these two biocontrol agents. Furthermore, RSN439 has stronger virulence to potato among four *R. solanacearum* strains. Hence, we determined the disease severity of potato inoculated with *R. solanacearum* RSN439, and found that the disease severity significantly reduced to 20% ($P = 0.0009$) or 40% ($P = 0.0135$) after treatment with Ba01 or PMB01, respectively. As for plant defensive responses, leaves obtained from potato plants inoculated with *R. solanacearum* RSN439 and Ba01 or PMB01 simultaneously increased the accumulation of reactive oxygen species (ROS). In conclusion, potato bacterial wilt can be controlled by *B. amyloliquefaciens* Ba01 effectively due to the inhibition of *R. solanacearum*, the secreting of extracellular enzymes, phosphate solubilization and ROS accumulation in potato plants.

Key words: Potato bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01, Biological control.

Received: September 3, 2020; Accepted: November 26, 2020.

* Corresponding author, e-mail: ychen28@ntu.edu.tw
1 Master's student, Master Program for Plant Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Crop Environment Section, Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Tainan City, Taiwan, ROC.
3 Assistant Research Fellow, Plant Pathology division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
4 Associate Research Fellow, Crop Environment Section, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
5 Professor, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung County, Taiwan, ROC.
6 Associate Professor, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):43–53 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0004

研究報告

4-4 式波爾多液對咖啡銹病防治效果評估

倪蕙芳[1] 許淑麗[2] 賴素玉[2] 張淑芬[3] 林靜宜[4,*]

摘要

倪蕙芳、許淑麗、賴素玉、張淑芬、林靜宜。2021。4-4 式波爾多液對咖啡銹病防治效果評估。台灣農業研究 70(1):43–53。

咖啡銹病為全世界咖啡產業最重要的病害，於全球咖啡產區普遍發生。本研究經調查發現台灣栽植的咖啡銹病發生期為 8–12 月，並於咖啡植株的下層葉發生較為嚴重。咖啡銹病菌孢子於含游離水 6 h 的條件下，以 20–25℃發芽率最佳，發芽率可達 72% 以上，但 10℃以下及 35℃以上則不利於發芽。由於國內尚無核准使用之推薦藥劑提供咖啡銹病防治，因此本研究利用亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (neutralized phosphorous acid solution; NPA) 及 4-4 式波爾多液作為咖啡銹病防治資材，進行防治效果試驗評估。田間試驗結果顯示，4-4 式波爾多液可降低咖啡銹病的罹病度，防治效果最為顯著。4-4 式波爾多液適當的使用時機與方法，經試驗後發現於雨季來臨前使用 1–2 次即可有效降低咖啡銹病的發生，於施用 3 mo 後之罹病度分別為 5.45% 與 4.23%，與對照組 35.47% 罹病度有顯著性差異。本研究亦發現咖啡銹病菌之孢子以 4-4 式波爾多液處理 6 h 後，其發芽率仍為 0%，顯示 4-4 式波爾多液確實可藉由抑制銹病孢子發芽進而降低銹孢子侵染而達到防治功效。此外，咖啡果實銅殘留量測定結果，顯示施用 1 次 4-4 式波爾多液後 3 mo，其果實上殘留之銅量為 8.43 mg kg^{-1}，遠低於歐洲執行委員會 (European Commission) 對咖啡豆訂定之銅容許量標準 (50.00 mg kg^{-1})。因此，4-4 式波爾多液可安全使用於咖啡豆的生產，而本研究之結果未來有潛力可作為田間防治咖啡銹病之參考。

關鍵詞：波爾多液、亞磷酸、咖啡、銹病。

前言

咖啡 (*Coffea* spp.) 為茜草科 (Rubiaceae) 常綠灌木，原產於熱帶非洲。早於西元 575 年開始，葉門地區即有栽種與使用的紀錄，約於 1615 年歐洲地區開始飲用咖啡 (Mussatto *et al*. 2011)。自此，長久以來咖啡飲品已傳播至世界各地，並深受大眾喜愛，亦使咖啡成為世界重要的經濟作物。適合咖啡生長分布的區域約在以赤道為中心至南北迴歸線之間，因此全球咖啡主要產區集中於拉丁美洲、非洲及亞洲的熱帶或亞熱帶的大陸或島嶼。台灣地處北迴歸線，整體風土條件適合咖啡栽種，根據農委會統計資料顯示 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx)，台灣咖啡種植面積於 2008 年僅 608.32 ha，近年來隨著喝咖啡的人口數增加，對咖啡豆需求與日俱增，促使種植面積逐漸成長。至 2019 年面積已達 1,155.70 ha，已成為台灣近年來新興的經濟作物，目前則以阿拉比卡咖啡品種的種植最為常見。

咖啡生產的過程中常受到數種病蟲害威脅，台灣已知的咖啡病害種類有 *Cercospora coffeicola* 引起之褐眼病 (brown eyespot)、*Colletotrichum gloeosporioides* 引起之炭疽病 (anthracnose) 及 *Hemileia vastatvix* 引起之銹病 (rust; leaf rust)

投稿日期：2020 年 11 月 2 日；接受日期：2020 年 12 月 8 日。
* 通訊作者：eris2024@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系副研究員。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

等，蟲害則有咖啡木蠹蛾 (*Zeuzera coffeae*)、東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis*) 及咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 等 (Chen 2007; Lin *et al*. 2010; Tzeng 2019; Ni *et al*. 2020)。其中，咖啡銹病最早是由英國探險家於1861年在肯亞的維多利亞湖附近之野生種咖啡上發現 (Talhinhas *et al*. 2017)，在台灣則由 Sawada 於 1922 年記錄後 (Tzeng 2019)，後續國內並無相關的詳細報告。咖啡銹病菌為絕對寄生真菌，主要藉其產生之夏孢子 (urediniospore) 經由風雨傳播。咖啡葉片為主要受感染的部位，多於初期葉面出現淺黃色圓斑，葉背則顯現黃橙色粉狀黴斑，尤其於產孢時最為明顯。當咖啡銹病發生嚴重時，植株之光合作用能力降低、提早落葉，進而影響果實生長導致品質與產量低下 (Cressey 2013)。咖啡銹病曾於斯里蘭卡大發生，導致斯里蘭卡的咖啡產業幾乎被摧毀 (Morris 1880)，隨後咖啡銹病陸續傳播至世界各地主要的咖啡生產國，使咖啡銹病成為影響咖啡生產之重要限制因子之一。近年，此病害於世界咖啡主要產區的中南美洲地區爆發大流行，造成中美洲 2013–2014 年咖啡產量較上一年度減少超過 17% (McCook & Vandermeer 2015)，並連帶影響之後的生產，嚴重發病的咖啡樹甚至三年後才能再開始結果，對當地咖啡產業造成重大打擊，同時也影響許多咖啡工人的生計 (Avelino *et al*. 2015)。

目前國外對於咖啡銹病的防治方法，主要有栽種抗病品種與使用化學藥劑防治 (Talhinhas *et al*. 2017)。由阿拉比卡 (*Coffea arabica*) 與羅布斯塔 (*Coffea canephora*) 的種間自然雜交品種 ‘Hibri de Timor’ (‘HDT’) 對咖啡銹病表現之抗性較強，但因風味及市場需求等因素，故商業栽培面積並不大，常作為抗病育種之種原 (Rodrigues *et al*. 1975; Talhinhas *et al*. 2017)。因此，現今主要的咖啡栽培區一般仍多採用銅劑及史托比類 (strobilurins) 的藥劑防治咖啡銹病 (McCook & Vandermeer 2015)。

近年來隨著咖啡成為廣受國人喜愛的飲品及咖啡豆之經濟價值提高，使咖啡在台灣已成為新興的經濟栽培作物。然而，國內尚無核准使用之推薦藥劑提供防治咖啡銹病，且多數農友朝向有機或友善環境的方式耕作咖啡。因此，需仰賴適當的整枝、修剪、合理化的施肥等耕作管理措施作為防治策略，以預防咖啡銹病發生。本研究利用亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (neutralized phosphorous acid solution; NPA) 及 4-4 式波爾多液 (Bordeaux mixture) 作為防治資材，探討應用於咖啡銹病之防治效果及其適當的使用方式，以作為農友田間防治之參考。

材料與方法

咖啡銹病發生調查與病徵

本試驗以行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所之古坑農場內的咖啡園作為調查試區，於 2018 年進行咖啡銹病發生調查。試驗於調查試區內選定 8 株咖啡樹，每月調查病害發生情形。每株逢機調查上位層枝條 5 枝及下位層枝條 5 枝，每枝條以展開葉開始記錄 10 葉之罹病病斑面積級數，依下述罹病指數 (disease index) 分別觀察記錄上位層 50 葉、下位層 50 葉之罹病等級及發病情形，並計算罹病度 (disease severity)。罹病指數分為 3 級：0 級為無病徵、1 級為 < 10% 葉片面積出現病斑、2 級為 10–30% 葉片面積出現病斑及 3 級為 > 30% 葉片面積出現病斑 (Phiri *et al*. 2001)，再依照下列公式計算罹病度。罹病度 (%) = Σ(指數 × 該指數罹病葉數)/(3 × 總調查葉數) × 100%。另外，將採集之病葉病斑以光學顯微鏡 (Nikon 80i, Nikon, Tokyo, Japan) 及桌上型掃描式電子顯微鏡 [scanning electron microscope (SEM), TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan] 進行病徵上病兆觀察。

溫度對咖啡銹病菌孢子發芽之影響

自田間無使用農藥栽培管理之咖啡園採集銹病罹病葉，收集葉背上新鮮黃橙色粉狀銹孢子堆，利用無菌水洗下銹孢子，製作供試孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})。再以滅菌之微量吸管吸取 30 μL 之孢子懸浮液，置於 3 凹載玻片之凹槽內。供試載玻片置於加有 1 mL 無菌

水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中培養。培養 6 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每處理 2 皿，6 重複，本試驗重複進行 2 次。

4-4 式波爾多液與 NPA 之製備

波爾多液依加入之硫酸銅 ($CuSO_4$) 及生石灰 (CaO) 含量而有不同濃度的配方，本試驗使用 4-4 式波爾多液 (1 L 含有 4 g 硫酸銅與 4 g 生石灰)，將所需水量等分為兩桶，分別溶解等重量之硫酸銅與生石灰 (均購於聯合農業資材行，台灣嘉義縣)。再將硫酸銅溶液緩緩倒入石灰水中，並於倒入過程中不停攪拌以利兩者充分混合，完成配製後當日施用。

亞磷酸 (phosphorous acid; H_3PO_3) 為白色透明結晶體，具強酸性，需以氫氧化鉀中和後方能施用。本試驗使用 NPA 之濃度為 1 gL^{-1}，分別稱取等重量的亞磷酸 (99% H_3PO_3) 及氫氧化鉀 (95.5% KOH) (均購於禾康肥料有限公司，台灣台中市)。配製溶液時，先將亞磷酸加入水中，待完全溶解後再加入氫氧化鉀溶解，並於配製完成後於當日使用 (Ann 2001)。

4-4 式波爾多液與 NPA 對咖啡銹病發生之影響

本試驗以嘉義農業試驗分所之古坑農場內的咖啡園作為試驗田區，並以田間自然發病方式進行藥效評估。藥劑採用葉面噴施方式，分為 4-4 式波爾多液與 1 gL^{-1} NPA 之 2 種處理組及不噴藥處理之對照組 (control check; CK)，使用之藥劑皆當日配製使用。每處理 4 重複，每重複 2 株植株。試驗於 2018 年 3–8 月進行施用，每個月施用 1 次，共使用 6 次。藥劑施用以背負式噴霧機進行，直至將整株咖啡植株均勻噴濕為止。最後 1 次噴施藥劑前 (8 月)，進行銹病發生情形調查 1 次，之後每月定期調查植株葉部銹病發生情形。調查方式如下：每株逢機調查 10 枝條，每枝條以展開葉開始記錄 10 葉之罹病病斑面積級數，依前述之罹病指數分別觀察記錄 100 葉之罹病等級及發病情形，並依前述公式計算罹病度。

4-4 式波爾多液使用時機對咖啡銹病發生之影響

此試驗於 2019 年以嘉義農業試驗分所之古坑農場的咖啡園作為試驗田，利用田間自然發病方式進行藥效評估。藥劑為 4-4 式波爾多液，採用葉面噴施方式。試驗採逢機完全區集設計，試區為 4 行區，重複 3 次，每重複 2 株植株。分為 3 種處理，A：雨季施用 1 次 (6 月)；B：雨季 (6 月) 及發病期前 (7 月) 分別施用 1 次；C：發病初期 (7 月) 施用 1 次及 CK：不做藥劑處理之對照組。施藥後每月調查植株銹病發生情形，連續調查 4 次。調查方式為每株逢機調查 10 枝條，每枝條以展開葉開始記錄 10 葉之罹病病斑面積級數，依前述之罹病指數分別觀察記錄 100 葉之罹病等級及發病情形，並依公式計算罹病度。

4-4 式波爾多液對病原菌孢子發芽之影響

生體外 (*in vitro*) 試驗：自田間無農藥栽培管理之咖啡園採集銹病罹病葉，挑選葉背上新鮮黃橙色粉狀銹孢子堆，利用當日配製之 4-4 式波爾多液洗下銹孢子，製作供試孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})。再以滅菌之微量吸管吸取 30 μL 之孢子懸浮液，置於 3 凹載玻片之凹槽內。供試載玻片置於加有 1 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，培養皿置於 25℃之定溫箱經 6 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每處理 2 皿，6 重複。本試驗重複進行 2 次，另以無菌水處理作為對照組。

本試驗亦於植體咖啡葉上進行，將 4-4 式波爾多液均勻噴灑至植體咖啡葉之正反兩面，待表面藥劑風乾後摘下作為試驗材料來源。試驗使用之孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})，則是利用無菌水將田間咖啡罹病葉背上之新鮮黃橙色粉狀銹孢子堆洗下製成。再以滅菌之微量吸管吸取 20 μL 之孢子懸浮液，滴至葉背上，選用葉片為已完全展開且未革質化之咖啡新葉。供試葉片置於加有 1 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，培養皿置於 25℃之定溫箱經 6 h 後，加入 20 μL 染色劑 (trypan blue,

Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 進行染色。30 min 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每處理 2 皿，6 重複。本試驗重複進行 2 次，另以無藥劑處理作為對照組。

4-4 式波爾多液處理之植株葉片與果實銅殘留量測定

試驗於嘉義農業試驗分所之古坑農場的咖啡試驗田，將 4-4 式波爾多液以背負式噴霧機進行植株葉面噴施，直至將整株咖啡植株均勻噴濕為止。此試驗處理 2 株植株，3 重複。另以無藥劑處理作為對照組。待施用之藥劑風乾之後，每重複組採集 50 g 之植株葉片送至 SGS 台灣檢驗科技股份有限公司 (台灣高雄市)，進行重金屬銅含量分析 (定量極限 2.00 mg kg^{-1})，以感應耦合電漿原子發射光譜儀 (inductively coupled plasma optical emission spectrometer; ICP-OES) 分析。之後每月送驗一次，共檢測 4 次，藉以觀察咖啡葉片銅殘留量的消退情形。果實之銅殘留量測定，則於施藥 3 mo 後採集紅色咖啡果實，每重複組採集 50 g，利用與咖啡葉片檢測相同方式進行重金屬銅含量分析。

統計分析

試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (Fisher's least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

咖啡銹病發生調查與病徵觀察

咖啡銹病發生調查結果顯示，8–12 月為銹病發生期，其他月分並未觀察到病害發生。上層葉 8–9 月之罹病度低於 5%，而 10–12 月之罹病度皆高於 10%，其中罹病高峰點落於 10–11 月之間，其罹病度可達 15% (圖 1)。下層葉於 8 月之罹病度低於 2%，9–12 月之罹病度皆高於 14%。其中，罹病高峰點落於 10 月，其罹病度可達 26%，其次為 11 月之 24% (圖 1)。咖啡銹病於葉片之初期病徵為葉面出現淡黃色圓斑 (圖 2A)，葉背則出現黃橙色粉狀斑

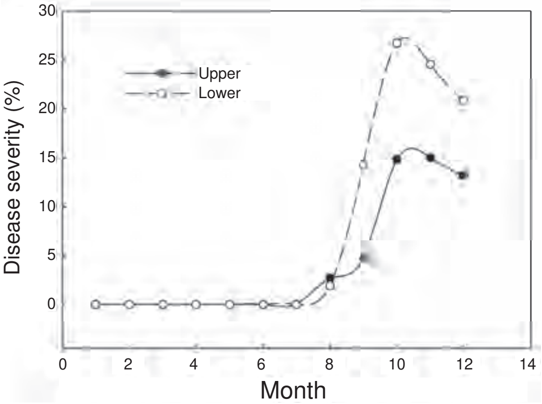

圖 1.　咖啡銹病於上層葉與下層葉之罹病度調查。

Fig. 1. Disease severity of coffee leaf rust observed in the branches of the upper and lower canopy of coffee plants.

(圖 2B)，產孢時最為明顯，後期葉面病斑褐化壞疽。將罹病組織進一步以 SEM 觀察，發現下表皮的夏孢子堆多由氣孔產出 (圖 2C)，且夏孢子呈長橢圓形或腎形，表面具刺狀構造 (圖 2D)。

溫度對咖啡銹病菌孢子發芽之影響

本研究進行溫度對咖啡銹病菌孢子發芽之影響，結果如圖 3 所示。於溫度 10、35 及 40℃時，孢子在游離水中 6 h 仍無法發芽，然而在 20–25℃含游離水的條件下，發芽率最佳，均達 72% 以上的發芽率，其次為 30℃時的發芽率為 65.5%；而在 15℃時之發芽率為 61.7%。

4-4 式波爾多液與 NPA 對咖啡銹病發生之影響

為了篩選對咖啡銹病具有效果之防治資材，本試驗分別利用 4-4 波爾多液及 NPA (1 gL^{-1}) 單位不分行進行田間藥效測試，皆於 3–8 月期間每月施用一次。調查結果顯示，未施用藥劑之對照組於 8 月開始發生咖啡銹病，罹病度為 2.30%，9 月時上升至 9.45%，10 月為 20.79%，11–12 月之罹病度則皆高於 17% (圖 4)，並有落葉的現象。NPA 處理組亦於 8 月開始發生咖啡銹病，罹病度 0.68%，9 月時為 4.13%，10 月之罹病度上升至 16.50%，至

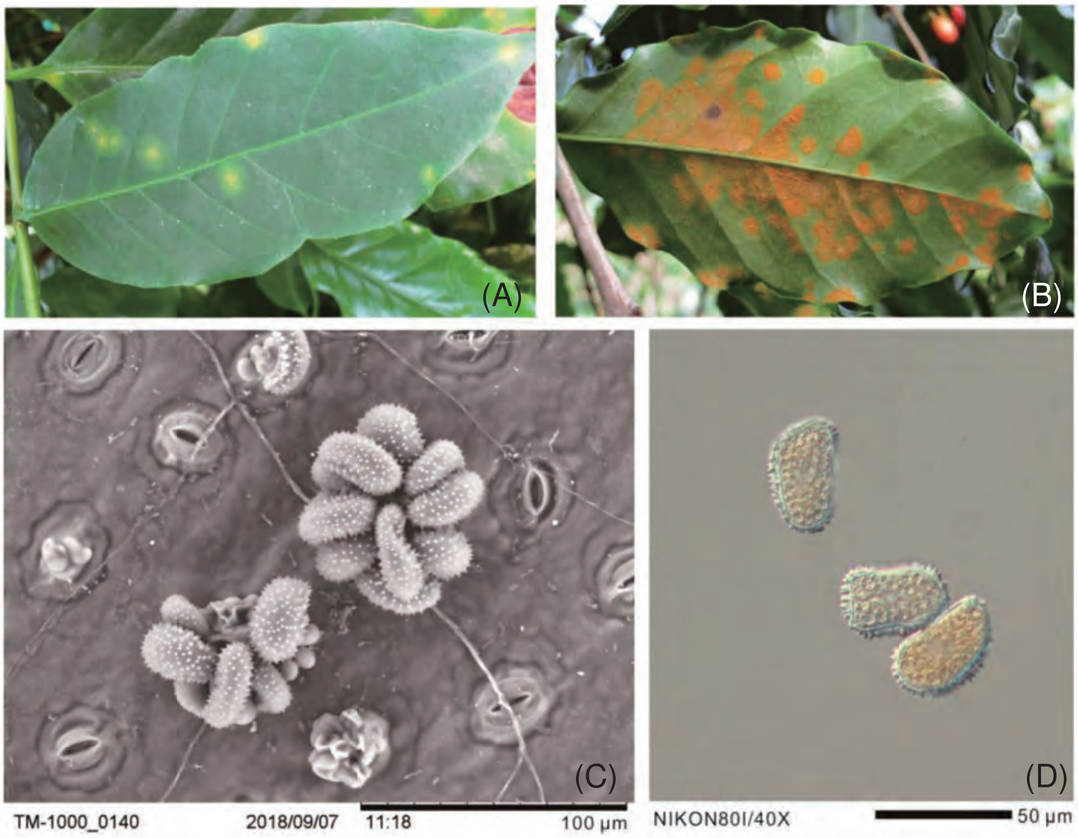

圖 2. 由 *Hemileia vastatvix* 引起的咖啡銹病葉片病徵與孢子型態。(A) 感染初期葉面出現淡黃色圓斑；(B) 為葉背上黃橙色粉狀斑；(C) 以 SEM 觀察葉背夏孢子堆；及 (D) 光學顯微鏡下觀察之孢子型態。

Fig. 2. The symptoms caused by *Hemileia vastatvix* on coffee leaves and morphology of urediniospore. (A) Yellowish spots on the coffee leaf in initial stage; (B) orange, powdery blotches occur on the underside of leaves; (C) scanning electron micrographs of urediniosporic sorus on the underside of a coffee leaf; and (D) light microscope of urediniospore.

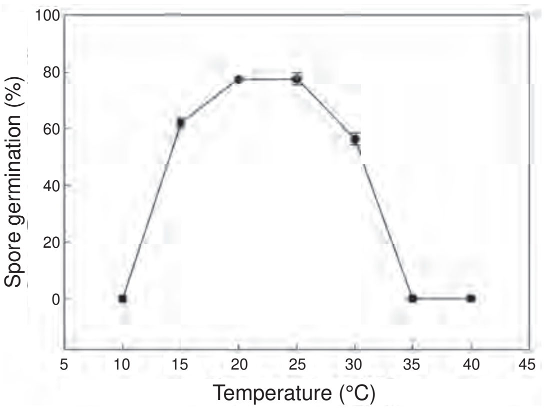

圖 3. 溫度對 *Hemileia vastatvix* 孢子發芽之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the spore germination of *Hemileia vastatvix*.

11–12 月時罹病度已高於 20% (圖 4)。至於施用波爾多液之處理組，8–9 月期間並未觀察到銹病的病徵出現，直至 10 月開始發生咖啡銹病，罹病度為 0.29%，11–12 月期間內的罹病度皆低於 0.13% (圖 4)。

4-4 式波爾多液使用時機對咖啡銹病發生之影響

本試驗分別將 4-4 式波爾多液於雨季施用 1 次 (處理 A)、雨季及發病初期分別施用 1 次 (處理 B) 及發病初期施用 1 次 (處理 C)，共 3 種施用方式藉以探討使用時機及次數對防治咖啡銹病之效果。結果顯示，雨季施用 1 次之處理 A，於 8 月調查之咖啡銹病罹病度僅

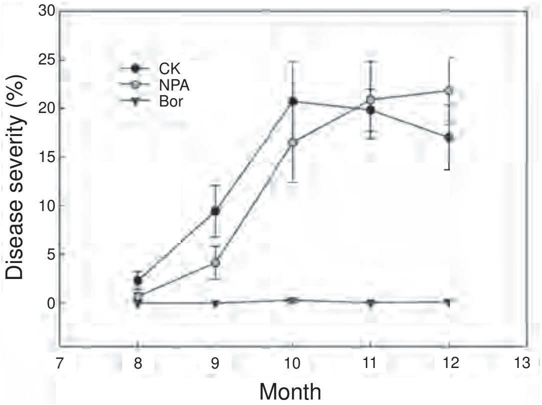

圖 4. 4-4 式波爾多液 (Bor) 與亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (NPA) (1 g L^{-1}) 對防治咖啡銹病發生之效果。CK：對照組，不作藥劑處理。

Fig. 4. Effect of 4-4 Bordeaux mixture (Bor) and neutralized phosphorous acid solution (NPA) (1 g L^{-1}) on disease severity of coffee leaf rust, respectively. CK: mock control.

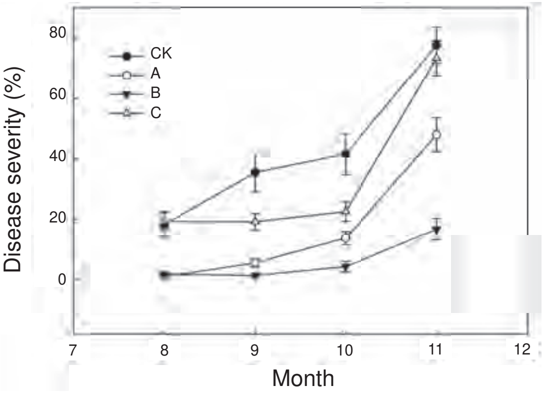

圖 5. 4-4 式波爾多液施用時機對防治咖啡銹病之影響。A：雨季 (6 月)；B：雨季 (6 月) 及發病初期 (7 月) 分別施用 1 次；C：發病初期 (7 月) 施用 1 次；及 CK：不做藥劑處理之對照組。

Fig. 5. Application timing of 4-4 Bordeaux mixture for the management of coffee leaf rust. A: application once on rainy season (June); B: each application once on rainy season (June) and at initial stage of coffee leaf rust emerging (July); C: application once at initial stage of coffee leaf rust emerging (July); and CK: mock control.

0.95%，9 月時之罹病度為 5.45%，10 月上升至 13.73%，11 月則大幅增加至 48.02% (圖 5)。若於雨季及發病初期分別施用 1 次之處理 B，其罹病度 8–9 月期間皆低於 2.00%，10 月微幅上升至 4.23%，11 月則增加至 16.72% (圖 5)。於發病初期施用 1 次波爾多液之處理 C 防治結果發現，8 月及 9 月其罹病度分別為 19.33% 與 19.23%，10 月微幅上升至 22.57%，11 月則增加至 73.45% (圖 5)。而不做藥劑處理之對照組 (CK)，其 8 月調查之咖啡銹病罹病度為 18.22%，9 月之罹病度已上升至 35.47%，10 月為 41.60%，11 月大幅增加至 77.63% (圖 5)。

4-4 式波爾多液對病原菌孢子發芽之影響

本研究進行 4-4 式波爾多液對咖啡銹病菌孢子發芽之影響，分別於載玻片 (*in vitro*) 與已完全展開且未革質化之咖啡新葉上進行試驗。結果發現於 25℃的條件下，無論是於載玻片與新鮮咖啡葉上進行試驗，以 4-4 式波爾多液處理之孢子在游離水中 6 h 後仍無法發芽，而無藥劑處理之對照組均可達 60% 以上的發芽率 (表 1)。

植株葉片與果實之銅殘留量測定

為瞭解歸類於銅劑之波爾多液使用後，殘留於咖啡葉片上之銅量的消退情形，本研究每月採集咖啡葉片進行重金屬銅含量分析。結果顯示，使用 4-4 式波爾多液後之當日 (6 月) 銅殘留量達 493.00 mg kg^{-1}，使用後 1–2 個月 (7–8 月) 銅殘留量仍分別有 472.00 mg kg^{-1} 及 333.00 mg kg^{-1}，直到使用後 3 mo (9 月) 銅殘留量下降至 91.00 mg kg^{-1}；另外，咖啡果實於

表 1. 4-4 式波爾多液對咖啡銹病菌孢子發芽之影響。

Table 1. Bordeaux mixture effect on spore germination of coffee leaf rust (*Hemileia vastatvix*) at 25℃ after 6 h of incubation.

Treatment	Spore germination (%)^{z} *In vitro*^{y}	Spore germination (%)^{z} Detached leaves^{x}
4-4 Bordeaux mixture	0 a^{w}	0 a
CK^{v}	60.1 b	60 b

^{z} Spore germination (%) = (numbers of spore germinated/100 spores) × 100%.
^{y} *In vitro*, the experiment was conducted on micorslide.
^{x} Detached leaves, the experiment was conducted on coffee leaves.
^{w} Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's least significant difference (LSD) test.
^{v} CK: control check. Treated with distilled water.

9 月時進行採集送檢，銅殘留量為 8.43 mg kg^{-1} (表 2)。無藥劑處理之對照組，無論是葉片或果實，其銅殘留量皆低於為 8.43 mg kg^{-1} (表 2)。

討論

咖啡銹病為影響全球咖啡產量最重要的真菌病害之一，在全球咖啡產地普遍發生 (Silva *et al*. 2006)，嚴重影響咖啡生產及農民經濟收入。根據前人研究調查顯示，台灣台南市東山地區之咖啡銹病於雨季開始發生，高溫多濕的 8–12 月發生嚴重 (Chen 2007)。而本研究於 2018 年病害發生調查結果發現，雲林縣古坑地區之咖啡銹病亦發生於 8–12 月。銹病菌 (*H. vastatvix*) 主要利用夏孢子侵入感染寄主植物，而侵入感染時，溫度與游離水的存在為感染成功的必要條件；本研究發現咖啡銹病菌孢子於含游離水的條件下，15–30℃發芽率皆高於 61%，其中以 20–25℃發芽率最佳。台灣月均溫約為 15–30℃之間，適宜咖啡銹病菌孢子發芽，因此在台灣銹病的蔓延與進展，游離水的存在為關鍵要素。故台灣咖啡銹病多見於雨季，長期乾季則不利發病。台灣一年之中以 5–6 月的梅雨季及 7–9 月的颱風季降雨最多，連續降雨使咖啡園區大多處於高濕環境，葉表的游離水膜極利於銹病菌夏孢子的侵染。然而，近年因全球暖化及氣候變遷的因素，極端天氣事件頻傳，降雨量亦受到影響。根據氣象局觀測資料查詢系統 (http://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp) 年報表顯示，2018 年古坑地區 5 月降雨量僅 51 mm，降水日數僅 4 d，而 6–8 月期間之每月降雨量皆大於 365 mm，降水日數每月亦大於 20 d，9 月及之後的降雨量及降水日數則大幅減少。因此，2018 年台灣之雨季集中於 6–8 月間。此外，銹病菌自感染至病斑表現的潛伏期 (incubation period; IP) 約需 3–6 wk，所以到了大量病徵表現觀察到時，常是在乾旱期間 (Pohlan & Janssens 2010)。是故本研究調查結果，為雨季的 8 月開始銹病發生，於雨季結束後之 10–11 月則為罹病度的高峰期。另一方面，本研究發現咖啡銹病於下層葉發生的罹病度較上層葉嚴重，可能與咖啡的下層葉有上層葉的遮阻，且又接近地面，致使下層葉濕度較高，可使游離水存在的時間較久，進而提升病原感染率有關。亦有文獻指出，咖啡成熟葉對銹病較為感病，而未展開之嫩葉則對銹病較有抗性 (Waller 1982)。未來可調查更多咖啡園區以瞭解咖啡銹病是否均於下層葉發生較為嚴重，並考慮栽培管理方式如遮陰條件、修枝時間及方式等因素對病害發生之影響，藉以釐清咖啡銹病罹病度與葉片層之相關性。

有鑑於國內尚無核准之推薦藥劑提供農民防治咖啡銹病使用，本研究利用 1 gL^{-1} 之 NPA 及 4-4 式波爾多液作為防治資材，評估兩者應用於咖啡銹病之防治效果。田間試驗結果顯示，兩者皆可降低咖啡銹病的罹病度，其中以 4-4 式波爾多液防治功效最為顯著，NPA 僅能降低銹病發病初期之罹病度。目前已有許多研究報導證實亞磷酸對卵菌類引起之病害 (oomycetes diseases)、作物的疫病、晚疫病及白粉病等真菌病害具有良好的防治效果 (Cohen & Coffey 1986; Ann 2001; Johnson *et al*. 2007)，亦可應用於咖啡炭疽病之防治 (Ogoshi *et al*. 2013)。亞磷酸防治真菌病害之作用機制，目前已被證實除了可間接誘導植物增強抗病性之外，也能藉由直接抑制病原菌之菌絲或孢子發芽以達到保護寄主的目的 (Grant *et al*.

表 2. 施用 4-4 式波爾多液 1 次後咖啡葉片之銅殘留量。

Table 2. Residue of copper (Cu) after application once with 4-4 Bordeaux mixture.

Treatment	Cu (mg kg^{-1})				
	No. of leaves				No. of berries
Sampling date	2019/6/19	2019/7/10	2019/8/19	2019/9/18	2019/9/18
4-4 Bordeaux mixture	493.00	472.70	333.00	90.97	8.43
CK[z]	4.93	3.40	1.70	1.60	1.60

[z] CK: control check.

1990; Guest & Bompeix 1990)。近來則有研究證實，亞磷酸錳 (manganese phosphite) 於溫室與田間試驗，皆可降低咖啡銹病的發生，防治率可達 58–63% (Costa *et al*. 2014; Monteiro *et al*. 2016)。其防治效果與本研究中使用之 NPA 相較，亞磷酸錳的防治效果較為顯著。其可能原因為亞磷酸可誘導植物增強抗病性之外 (Monteiro *et al*. 2016)，另添加之錳元素可促進咖啡植株內酚化物 (total soluble phenols; TSP) 與木質素 (lignin) 之生合成，進而增強咖啡之抗銹病能力有關 (Pérez *et al*. 2020)。本研究以 NPA 施用結果發現，能小幅降低咖啡銹病發病初期之罹病度，未來可進一步探討 NPA 對銹病孢子發芽之影響及提高 NPA 濃度，或施用頻度對防治咖啡銹病之功效，藉以釐清 NPA 對咖啡銹病的作用機制。

波爾多液為廣效保護性殺菌劑，對多數之真菌性及細菌性病害均具有防治功效。目前 72% 波爾多為瓜類露菌病、楊桃細菌斑點病及柑橘潰瘍病等病害之防治推薦用藥。波爾多液中的主要殺菌成分是二價銅離子 (Cu^{2+})，銅離子可影響與真菌孢子發芽相關之酵素活性，進而抑制孢子發芽或是造成病原菌細胞代謝異常 (Liu *et al*. 2015)。本研究結果亦發現咖啡銹病菌之孢子以 4-4 式波爾多液處理 6 h 後，其發芽率仍為 0%，顯示 4-4 式波爾多液可藉由抑制銹病孢子發芽而達到防治功效。本研究之田間試驗也證實，4-4 式波爾多液對咖啡銹病具有極佳之防治效果。然而，植物亦會吸收銅離子，若過量施用容易造成藥害，同時也會增加銅於土壤的累積量，造成汙染。因此，本研究進一步探討 4-4 式波爾多液之使用次數與時機對防治咖啡銹病功效之影響。由每月咖啡銹病罹病度的調查結果顯示，使用 1 次 4-4 式波爾多液後的 3 mo 內，罹病度調查曲線平緩，可見罹病度增加幅度小，表示施用 1 次 4-4 式波爾多液的防治時效約可持續 3 mo。而第 4 個月罹病度大幅提高，表示波爾多液已失去防治的效果。若依施用時機的防治功效來看，於 6 月施用之防治成效較 7 月發病前期施用之效果佳，因波爾多液為保護性藥劑，於 6 月施用亦即是雨季來臨前期施用，可藉由預防性施用有效抑制咖啡銹病的感染源，降低雨季過後的發病率；若於 7 月發病前期施用，時序已進入雨季，高溫多濕的環境極利於咖啡銹病菌的侵入感染，甚至咖啡植株已開始發病。故於病原菌之感染源密度較高的條件下，使用波爾多液的防治效果較不顯著。若施用 4-4 式波爾多液的次數增加為 2 次，則防治效果可較只施用 1 次更為明顯，於施用後的 3 mo 內咖啡銹病的罹病度皆低於 5%，其防治時效也能延長至 4 mo，於第 4 個月之罹病度仍低於 20%。此外，近年在氣候變遷等因素影響之下，降雨型態變化劇烈，亦影響每年雨季開始的時間，依氣象局觀測資料查詢系統 (http://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp) 年報表顯示 2018 年古坑地區之雨季集中於 6–8 月，5 月降雨量僅 51.0 mm，降水日數僅 4 d；然而 2019 年之雨季則提早為 5–8 月，5 月降雨量已達 218.5 mm，降水日數為 18 d；6–8 月期間之每月降雨量皆大於 270.0 mm，每月降水日數亦大於 20 d。由於雨季有利咖啡銹病的發生，若雨季提早，亦會影響咖啡銹病的蔓延與進展。本研究即發現 2018 年與 2019 年之銹病罹病度調查中，無藥劑處理之對照組於同期 8 月之罹病度具有顯著的差異，2018 年罹病度為 2.30% 而 2019 年為 18.22%。綜上所述，4-4 式波爾多液之施用建議可於雨季前使用 1–2 次來防治咖啡銹病，以降低咖啡豆收成期 (9–10 月) 前銹病之危害率。

咖啡除了果實可作為咖啡豆的來源之外，近年來研究發現咖啡葉富含綠原酸等抗氧化及抗發炎能力的成分 (Tsai 2019)，故可利用田間栽培管理時整枝修剪下來之咖啡葉製成相關衍生產品，如咖啡葉茶等，可提高咖啡產業的附加價值，達成循環經濟效益。目前衛生福利部已預告訂定咖啡葉用於食品原料之相關規定，為瞭解波爾多液使用後銅於咖啡葉上之殘留情形，以避免危害人體健康。本研究對咖啡葉片上之銅量的消退情形進行檢測，結果顯示施用 4-4 式波爾多液後 3 mo，咖啡葉片上之銅量仍有 91.00 mg kg^{-1}。因此，若以咖啡葉為生產販售標的，則不建議使用波爾多液作為咖啡銹病之防治資材。咖啡果實於施用 1 次 4-4 式波爾多液後的 3 mo，其殘留銅量為 8.43 mg kg^{-1}。而咖啡豆因有果皮及果肉包裹，並未直接接觸

銅，且製成咖啡生豆前須經一系列清洗、去果肉、曝曬或烘烤等工序，咖啡生豆上殘留之銅量應可低於果實上之殘留銅量。參考歐洲執行委員會 (European Commission) 網站查詢咖啡豆之銅最大殘留容許量 (maximum residue limits; MRL) 為 50.00 mg kg^{-1} (https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en)，因此食用上較無疑慮。

由於咖啡銹病主要靠露水和雨水傳播，葉片游離水有利於孢子的發芽與侵染。因此，適當整枝修剪及調整栽培密度，可改善咖啡園環境光照及通風性，減少游離水存在的時間，亦能降低病害發生。此外，加強田間衛生，去除罹病葉及果實殘體以減少田間感染源、適當施肥，維持樹勢良好，但仍需避免氮肥過度施用，均是預防咖啡銹病發生的耕作防治策略。最後，適當使用防治資材以進行早期保護，避免對咖啡產量及品質產生巨大影響，影響農民收益。本研究已證實 4-4 式波爾多液對咖啡銹病之防治效果佳，建議可於雨季前使用 1–2 次 4-4 式波爾多液來防治咖啡銹病，但若以咖啡葉為生產標的，則不建議使用。波爾多液為應用範圍廣且效果好之植物病害防治資材，亦是有機農業規範中可合法使用的防治資材種類，可降低對生態環境的衝擊，而且價格便宜、使用方式簡便，對農民助益良多。以上資訊，可提供相關農政單位擬定咖啡銹病防治策略之參考。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所曾添水與張釗明先生協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Ann, P. J. 2001. Control of plant diseases with non-pesticide compound-phosphorous acid. Plant Prot. Bull. 10:147–154. (in Chinese with English abstract)

Avelino, J., M. Cristancho, S. Georgiou, P. Imbach, L. Aguilar, G. Bornemann, P. Läderach, F. Anzueto, A. J. Hruska, and C. Morales. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): Impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Sec. 7:303–321. doi:10.1007/s12571-015-0446-9

Chen, F. J. 2007. Preliminary Survey of Pests and Diseases of Coffee at Dong-shan Area and Screening of Agrochemicals for Rust. Master Thesis, Department of Biotechnology, National Kaohsiung Normal University. Kaohsiung, Taiwan. 72 pp. (in Chinese with English abstract)

Cohen, Y. and M. D. Coffey. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 24:311–338. doi:10.1146/annurev.py.24.090186.001523

Costa, B. H. G., M. L. V. de Resende, P. M. Ribeiro Júnior, S. M. Mathioni, M. A. Pádua, and M. B. da Silva Júnior. 2014. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. J. Phytopathol. 162:635–642. doi:10.1111/jph.12237

Cressey, D. 2013. Coffee rust regains foothold. Nature 493:587. doi:10.1038/493587a

Grant, B. R., R. H. Dunstan, J. M. Griffith, J. O. Niere, and R. H. Smillie. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. Australas. Plant Pathol. 19:115–121. doi:10.1071/APP9900115

Guest, D. I. and G. Bompeix. 1990. The complex mode of action of phosphonates. Australas. Plant Pathol. 19:113–115. doi:10.1071/APP9900113

Johnson, D. A., D. A. Inglis, and J. S. Miller. 2007. Control of potato tuber rots caused by oomycetes with foliar applications of phosphorous acid. Plant Dis. 88:1153–1159. doi:10.1094/PDIS.2004.88.10.1153

Lin, M. Y., Y. F. Wu, and S. K. Chen. 2010. Monitoring survey of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and its control in the field. Res. Bullet. Tainan Dist. Agric. Improve. Sta. 56:35–44. (in Chinese with English abstract)

Liu, H., B. Zhang, T. Wu, Y. Ding, X. Ding, and Z. Chu. 2015. Copper ion elicits defense response in *Arabidopsis thaliana* by activating salicylate- and ethylene-dependent signaling pathways. Mol. Plant 8:1550–1553. doi:10.1016/j.molp.2015.07.008

McCook, S. and J. Vandermeer. 2015. The big rust and the red queen: Long-term perspectives on coffee rust research. Phytopathology 105:1164–1173. doi:10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW

Monteiro, A. C. A., M. L. V. de Resende, T. C. T. Valente, P. M. Ribeiro Junior, V. F. Pereira, J. R. de Costa, and J. A. G. da Silva. 2016. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. J. Phytopathol. 164:1043–1053. doi:10.1111/jph.12525

Morris, D. 1880. Note on the structure and habit of *Hemileia vastatrix*, the coffee-leaf disease of Ceylon and Southern India. J. Linnean Soc. Bot. 17:512–517. doi:10.1111/j.1095-8339.1880.tb01240.x

Mussatto, S. I., E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. Food Bioproc. Tech. 4:661–672. doi:10.1007/s11947-011-0565-z

Ni, H. F., C. Y. Lin, and C. J. Wu. 2020. Etiology and fungicide screening of coffee brown eye spot disease. J. Taiwan Agric. Res. 69:241–254. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202009_69(3).0006

Ogoshi, C., M. S. de Abreu, B. M. da Silva, H. S. Neto, P. M. Ribeiro Júnior, and M. L. de Resende. 2013. Potassium phosphite: A promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. Biosci. J. 29(Suppl. 1):1558–1565.

Pérez, C. D. P., E. A. Pozza, A. A. A. Pozza, W. H. Elmer, A. B. Pereira, D. da Silva Gomes Guimarães, A. C. A. Monteiro, and M. L. V. de Rezende. 2020. Boron, zinc and manganese suppress rust on coffee plants grown in a nutrient solution. Eur. J. Plant Pathol. 156:727–738. doi:10.1007/s10658-019-01922-9

Phiri, N. A., R. J. Hillocks, and P. Jeffries. 2001. Incidence and severity of coffee diseases in smallholder plantations in northern Malawi. Crop Prot. 20:325–332. doi:10.1016/S0261-2194(00)00161-7

Pohlan, H. A. J. and M. J. J. Janssens. 2010. Growth and production of coffee. p.102–134. *in*: Soils, Plant Growth and Crop Production. Volume III. (Verheye, W. H., ed.) Eolss Publishers Co. Ltd., Oxford, UK. 492 pp.

Rodrigues, C. J., Jr., A. J. Bettencourt, and L. Rijo. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annu. Rev. Phytopathol. 13:49–70. doi:10.1146/annurev.py.13.090175.000405

Silva, M. D. C., V. Várzea, L. Guerra-Guimarães, H. G. Azinheira, D. Fernandez, A. S. Petitot, B. Bertrand, P. Lashermes, and M. Nicole. 2006. Coffee resistance to the main diseases: Leaf rust and coffee berry disease. Braz. J. Plant Physiol. 18:119–147. doi:10.1590/S1677-04202006000100010

Talhinhas, P., D. Batista, I. Diniz, A. Vieira, D. N. Silva, A. Loureiro, S. Tavares, A. P. Pereira, H. G. Azinheira, and L. Guerra-Guimarães. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: One and a half centuries around the tropics. Mol. Plant Pathol. 18:1039–1051. doi: 10.1111/mpp.12512

Tsai, T. Y. 2019. Investigating the Major Compounds and Bioactivities in Coffee Leaves. Master Thesis, Department of Biochemical Science and Technology, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 60 pp. (in Chinese with English abstract)

Tzeng, S. S. 2019. List of Plant Disease in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 311 pp. (in Chinese)

Waller, J. M. 1982. Coffee rust- epidemiology and control. Crop Prot. 1:385–404. doi:10.1016/0261-2194(82)90022-9

Evaluation of Control Efficacy of 4-4 Bordeaux Mixture Against Coffee Rust

Hui-Fang Ni[1], Sui-Li Hsu[2], Su-Yu Lai[2], Shu-Fen Chang[3], and Ching-Yi Lin[4,*]

Abstract

Ni, H. F., S. L. Hsu, S. Y. Lai, S. F. Chang, and C. Y. Lin. 2021. Evaluation of control efficacy of 4-4 Bordeaux mixture against coffee rust. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):43–53.

Coffee rust disease caused by *Hemileia vastatvix* is one of the main limiting factors of coffee production worldwide. In Taiwan, coffee rust disease mainly occurs from August to December, and lower coffee tree canopy has more disease severity. With free water at 20–25℃, the spore germination ratio over 72% in 6 h. Spore germination was inhibited under 10, 35 and 40℃. Because currently recommended fungicides are not available for control coffee rust in Taiwan, the work present here was to evaluate the effects of neutralized phosphorous acid and 4-4 Bordeaux mixture on coffee rust, respectively. In field experiments, both materials suppressed the coffee rust disease with a reduction in disease severity, and noticeable suppression efficiency was found on the coffee trees sprayed with 4-4 Bordeaux mixture. Applicable timing and frequency of spraying 4-4 Bordeaux mixture were also conducted in field. The results indicated that spraying 1–2 times before rainy season was effective in suppress coffee rust disease. The disease severity was 5.45% at 3 mo after spraying once, while disease severity was 4.23% at 3 mo after spraying twice. *In vitro* inhibition of germination of *H. vastatvix* urediniospores was observed and indicated that 4-4 Bordeaux mixture exert some toxic effects to the fungi. In addition, coffee berries showed 8.43 mg kg^{-1} of copper residues at 3 mo after spraying 4-4 Bordeaux mixture. The copper residues of coffee berries observed in this study are far under the European existing maximum residue levels for copper compound of coffee bean. Thus, it suggests that 4-4 Bordeaux mixture may be used for controlling coffee rust effectively and safely. The study provides important reference for management of coffee rust disease in Taiwan in the future.

Key words: Bordeaux mixture, Neutralized phosphorous acid, Coffee, Coffee rust disease.

Received: November 2, 2020; Accepted: December 8, 2020.

[*] Corresponding author, e-mail: eris2024@dns.caes.gov.tw

[1] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Project Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):54–66 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0005
研究報告

花嘴鴨對插秧期水稻田的棲地選擇

洪美珠 [1]　許詩涵 [2]　曾信翰 [3]　葛兆年 [4,*]

摘要

洪美珠、許詩涵、曾信翰、葛兆年。2021。花嘴鴨對插秧期水稻田的棲地選擇。台灣農業研究 70(1):54–66。

台灣是重要的水鳥度冬場所，其中花嘴鴨 (*Anas zonorhyncha* Swinhoe) 為每年秋冬大量遷徙來台度冬的鳥類。但天然溼地面臨衰退，不少來台度冬的花嘴鴨轉而暫時棲息於水稻田，故水稻田除了生產水稻，亦成為度冬花嘴鴨族群的庇護所。花嘴鴨因影響水稻生長而受農民排斥甚至驅趕，目前缺乏友善方法來管理水稻及花嘴鴨，因此本研究目的在於從花嘴鴨的棲地利用方式來探討減緩農民與花嘴鴨之間競合的方法，以期水稻田兼顧保有水稻生產與花嘴鴨族群棲息的價值。本試驗於 2020 年 2 月水稻插秧期，在花蓮縣秀姑巒溪的周圍觀察 212 塊被花嘴鴨暫時棲息的水稻田，並收集 9 項地景結構因子及 8 項微棲地因子數據。結果發現，花嘴鴨傾向選擇離河川較近或者灌溉水圳沿線附近的水稻田，推測可能是為了節省往返覓食地與休息地的能量。此外，花嘴鴨傾向避開人工建物，並選擇人工建物比例較少的地點，此現象可能反映了人為干擾的壓力。從微棲地上的選擇來看，花嘴鴨傾向利用周圍有較高的草叢覆蓋度的水稻田，同時發現水稻田周邊有 20–40 cm 高的草叢是花嘴鴨較常利用的棲地，此種選擇可能也和人類干擾有關。平均水深是另一項重要影響因子，花嘴鴨數量有隨著插秧期水稻田的水深而逐漸增加的趨勢，而 3–6 cm 是其造訪頻度最高的水深範圍。由花嘴鴨對水稻田的棲地偏好分析結果，本文建議水鳥度冬期間仍然耕作的水稻田，插秧期水深保持在 3 cm 以下，周圍維持 20 cm 以下的低矮植被，可能減少花嘴鴨暫時棲息水稻田的機會。鄰近秀姑巒溪或寬度大於 3 m 灌溉水圳的水稻田，在水鳥保護上有其價值，建議政府考慮在此類區域提供水鳥保護補助，以鼓勵農民採行友善花嘴鴨的耕作管理方式。

關鍵詞：地景生態、農田生態系、灌溉水圳、人為干擾、水深。

前言

稻米是全世界重要糧食作物之一，種植面積廣泛占地球無冰陸地區域的 1% 且持續在增加中 (Maclean *et al*. 2002; Elphick 2010)。大部分的稻米生長在湛水的土壤裡，田間的湛水可以抑制雜草與保護秧苗免受極端溫度影響 (Ferrero & Tinarelli 2008; Elphick 2010; Longoni 2010)。同時，也為野生動物，尤其是水鳥，提供了半天然濕地的環境 (Lawler 2001; Elphick *et al*. 2010)。全世界的天然濕地因人類活動逐漸退化或消失，水鳥也被迫轉而在人工濕地 (例如水稻田) 中尋找食物以獲取能量 (Czech & Parsons 2002; Elphick 2010; Wood *et al*. 2010; Li *et al*. 2015)。世界各地每年有數百萬隻水鳥在遷徙過程中利用水稻田作為中途停留站或作為度冬地 (Elphick *et al*. 2010; Ibáñez *et al*. 2010; Longoni 2010; Vallon *et al*. 2018)，這些水稻田緩衝了天然濕地流失的衝擊，在提供食物與棲息地上發揮越來越多的功

投稿日期：2020 年 7 月 20 日；接受日期：2020 年 12 月 15 日。
* 通訊作者：nien@tfri.gov.tw
[1] 農委會林業試驗所森林保護組研究助理。台灣 台北市。
[2] 觀察家生態顧問有限公司研究員。台灣 台北市。
[3] 漢林生態顧問有限公司研究員。台灣 雲林縣。
[4] 農委會林業試驗所森林保護組研究員。台灣 台北市。

用。所以，人們對水稻田作為維持生態服務系統的價值，或水鳥繁殖棲息地的保護功能日益重視 (Elphick 2010)。

相較於天然濕地，水稻田環境是簡單且異質性低的棲息地，由多個相似的單元組合 (Elphick 2010; Elphick *et al*. 2010)，但水鳥如何選擇仍然很值得探討。遷移性的大型水禽主要會依地理尺度的順序來選擇棲息地，分別從地理區域、濕地系統、特定地點的位置，最後再到微棲地選擇 (Johnson 1980; Beatty *et al*. 2014; Kaminski & Elmberg 2014; Herbert *et al*. 2018)。台灣的地理區域位在許多水鳥主要遷徙路線上，每年都有大量不同的水鳥來台過境或度冬。水鳥行經濕地環境時，通常需利用一系列間接的環境暗示 (environmental cues) 去快速評估棲息地的品質 (Hollander *et al*. 2011)。在遷徙時間的限制下，這些環境特徵在時間序列上必須可靠且能反映棲息地的品質。例如水稻田可為水鳥提供可預測且集中的食物來源 (Allen 1987; Stafford *et al*. 2010; Herbert *et al*. 2018)，台灣東部的秀姑巒溪與兩側面積廣大的水稻田正具備此項環境特徵。對於特定位置的選擇，水稻田位置周圍景觀棲地的異質性，可能是影響水鳥選擇的重要因子，如不同的水域、灌溉溝渠、草生地、森林等土地覆蓋、棲地的連結，或距離天然濕地的遠近等 (Amano *et al*. 2008; Fasola & Brangi 2010; King *et al*. 2010)。 而水稻田因人工化環境所帶來的干擾，水鳥在其棲地選擇或行為上都會有所應對。例如美洲鶴 (*Grus americana*) 在人類活動區域較高的地區，通常會避開道路，或者有些個體選擇鄰近馬路但棲地質量相對較高的位置，以補償干擾造成的負面影響 (Pearse *et al*. 2017a, 2017b; Baasch *et al*. 2019)。相較於天然濕地，在水稻田的戴帽鶴 (*Grus monacha*) 會花更多時間警惕或更多的進食以維持活動 (Li *et al*. 2015)。對於微棲地因子的選擇，Ma *et al*. (2010) 回顧文獻指出影響水鳥會使用濕地的重要因子，包括水深、水位波動 (季節性的淹水或人工濕地中的灌溉)、植被、鹽度、食物的可及性、食物類型、濕地大小及濕地連結性等。其中，水深會限制水鳥的覓食機會，因而影響水鳥的分布已是一致性的結論 (Velasquez 1992; Elphick & Oring 1998; Colwell *et al*. 2000; Isola *et al*. 2000; Ma *et al*. 2010; Behney 2020)。

台灣位於東亞澳遷徙線 (East Asian-Australasian Flyway; EAAF) 上，是水鳥重要的度冬場所，但天然濕地在台灣面臨衰退與消失，不少來台灣度冬的水鳥轉為利用水稻田 (Lu 2019)。例如每年秋冬大量遷徙至台灣度冬的花嘴鴨 (*Anas zonorhyncha* Swinhoe)，選擇花蓮縣內秀姑巒溪為其主要的度冬棲息地之一 (Shyu & Lin 1993)。花嘴鴨體長可達63 cm，展翅寬可達90 cm，雄鳥略大。雌雄同色，身體主要為暗褐色，具有白色眉線與黑色過眼線，虹膜褐色，喙黑色其先端為黃色，腳橙紅色。花嘴鴨的食性為雜食性，以植物性食物為主，例如水生植物的草籽、芽、根、莖及水藻為主，也會攝食水生昆蟲及螺類等動物 (Severinghaus *et al*. 2012)。秀姑巒溪內的食物資源豐富，花嘴鴨早年多棲息於河川內 (Shyu & Lin 1993)，但在近二、三十年來，人為的開發與水文變化致使河川內可利用的的天然濕地逐漸消失，花嘴鴨轉而進入兩側的水稻田獲取食物與休息場所 (Shyu & Lin 1993)。花嘴鴨在韓國的度冬地，亦多選擇內陸水域如河流 (47.3%) 和稻田 (28.9%) 作為度冬區域，且水稻田亦證實被用作覓食場所 (Shin *et al*. 2016a)。雖然水稻田緩衝了天然濕地的衰退或消失，但當花嘴鴨進入農田時，尤其在水稻剛插秧時期與農民產生衝突，因為牠們會取食秧苗下方的穀粒，導致秧苗缺損而造成農民的經濟損失 (Shyu & Lin 1993)。農民為驅趕鴨子有時採取對環境不友善的方式 (Chen *et al*. 2019)，例如施放有毒藥物，但此種作法可能同時傷害鳥類、其他生物，甚至一般民眾。因此，有需要探討較友善的水稻田管理措施，並妥予調整，來減低花嘴鴨在插秧期對水稻田的暫時棲息與利用。

另一方面，據估計花嘴鴨總數量達 80–160 萬隻，但整體族群呈現下降趨勢 (BirdLife International 2018)。2000 年有超過 14 萬隻花嘴鴨到達韓國，但在 2003 年則顯著減少至 7–8 萬隻，在韓國的度冬地花嘴鴨的數量亦逐漸下降 (Shin *et al*. 2016b)。因此，雖然花嘴鴨的

族群尚未到瀕危，但應提早對水稻田等人工濕地進行管理，可有助維持花嘴鴨族群量，也友善其他生物及周遭環境。本研究旨在探討水稻插秧期花嘴鴨在地景 (特定位置) 及微棲地的尺度上對水稻田的棲地選擇，從其對棲地的偏好上提出水稻田的現地經營管理，以及政策上之建議，以期緩和水稻插秧期花嘴鴨與農民間的競合，並期以提升水稻田作為水鳥族群庇護所的功能 (Czech & Parsons 2002; Ma *et al*. 2010; Giosa *et al*. 2018)。

材料方法

研究樣區及花嘴鴨調查

樣區位於花蓮縣花東縱谷中段的秀姑巒溪河谷沖積平原，行政轄區涵蓋玉里鎮與富里鄉，地勢平坦且多為水稻耕作地的農業景觀。2019 年平均溫度 23.1℃，總降雨量 1,579 mm (2019 年玉里氣象站)。每年約在 2 月及 7 月進行插秧，插秧期間水稻田會進行水位的調整等農田管理，此時過境或是留鳥的花嘴鴨，會進入水稻田覓食或棲息。花蓮縣玉里鎮與富里鄉水稻田種植的面積廣泛，所種的水稻品種也相當多樣，例如「台稉 2 號」、「台稉 4 號」、「台稉 16 號」、「台稉 147 號」、「台稉 192 號」、「台稉 205 號」等皆是當地主要的栽培品種。水稻種植方式多以育秧移植為主，插秧的秧苗來自不同的秧苗場，供苗培育約 18–20 d 後會進行機械式插秧。插秧後的前 3 d 不進行淹水以利秧苗與泥土密合，3 d 後放水抑制雜草。淹水後花嘴鴨逐漸進入覓食，主要是拔起秧苗以取食秧苗下殘存的穀粒，導致農民必須重新補秧。當秧苗長高，秧苗下方穀粒消失後，花嘴鴨即不再拔取秧苗。

調查方式採全區一次性調查，在 2020 年 2 月 13 日至 2 月 22 日的冬季插秧期，劃定兩側以台九線與 193 縣道為邊界的範圍，北邊從三民里至南邊的萬寧村 (圖 1)，在劃設範圍內的水稻田進行全面調查，利用望遠鏡觀察、記錄花嘴鴨在水稻田的數量與定位取得其 GPS 位置，且即時測量所在農田的各項微棲地因子如下述。

環境因子調查

環境因子調查分為兩部分：地景結構因子及微棲地因子 (表 1)，因子乃參考文獻或現地評估重要者選取之。地景結構因子中，以花嘴鴨所在位置，劃設 500 m 的環域 (buffer zone)，此 500 m 的劃設係依據水鳥飛行、覓食和躲避干擾所需的緩衝距離。鳥類逃脫天敵的驚飛距離 (flight initiation distance; FID) 平均為 145 m (Mayer *et al*. 2019)，而 Fox & Madsen (1997) 建議敏感水鳥的覓食區域需是牠們 FID 的 3 倍，故取 500 m 環域為範圍。地景結構因子中，依據文獻指出水域等地景分類之比例 (He *et al*. 2011)，以及道路、建物 (Lu 2019) 等會影響水鳥對棲地的選擇。另依樣區現地觀察，農田與河流或與較大的灌溉水圳的遠近亦可能是影響因子，故蒐集 9 項地景結構因子分別為：(1) 水域比例 (water area ratio, %)、(2) 綠地比例 (vegetation area ratio, %)、(3) 沙灘地比例 (mudflat area ratio, %)、(4) 建物比例 (built area ratio, %)、(5) 道路比例 (road area ratio, %)、(6) 道路密度 (road density)、(7) 與馬路的接壤 (road adjacency，以面數代表)、(8) 與建物之距離 (distance to the nearest building, m) 及 (9) 與河流或寬度 > 3 m 灌溉水圳之距離 (waterway distance, m，以下合稱水道)。而寬度 > 3 m 的灌溉水圳，依現地觀察其水流較和緩，通常有植被適合水鳥棲息。水域依 Google Earth 上取得最相近的日期，即 2019 年 10 月的正射影像資料，繪製秀姑巒溪地面水及灌溉水圳的多邊形，其他各項地景分類如農田、植被、沙灘地、人工建物、道路等，取自國土測繪中心 2015 年的正射影像資料所做的土地利用類型。以上各項地景結構因子數值，係利用 QGIS 3.10 (QGIS.org. 2020) 計算取得。微棲地因子中，依據文獻指出水深與周圍植被覆蓋情形是影響水鳥選擇棲息地的重要因子。此外，依現地觀察到農田的平整與否與秧苗的高度，可能會影響花嘴鴨是否進入水稻田，故總共調查 8 項微棲地因子，分別為農田的 (1) 最大水深 (maximum water depth, cm)、(2) 平均水深 (average water depth, cm)、(3) 農田平整與否 (smooth or unsmooth)、(4) 秧苗高度

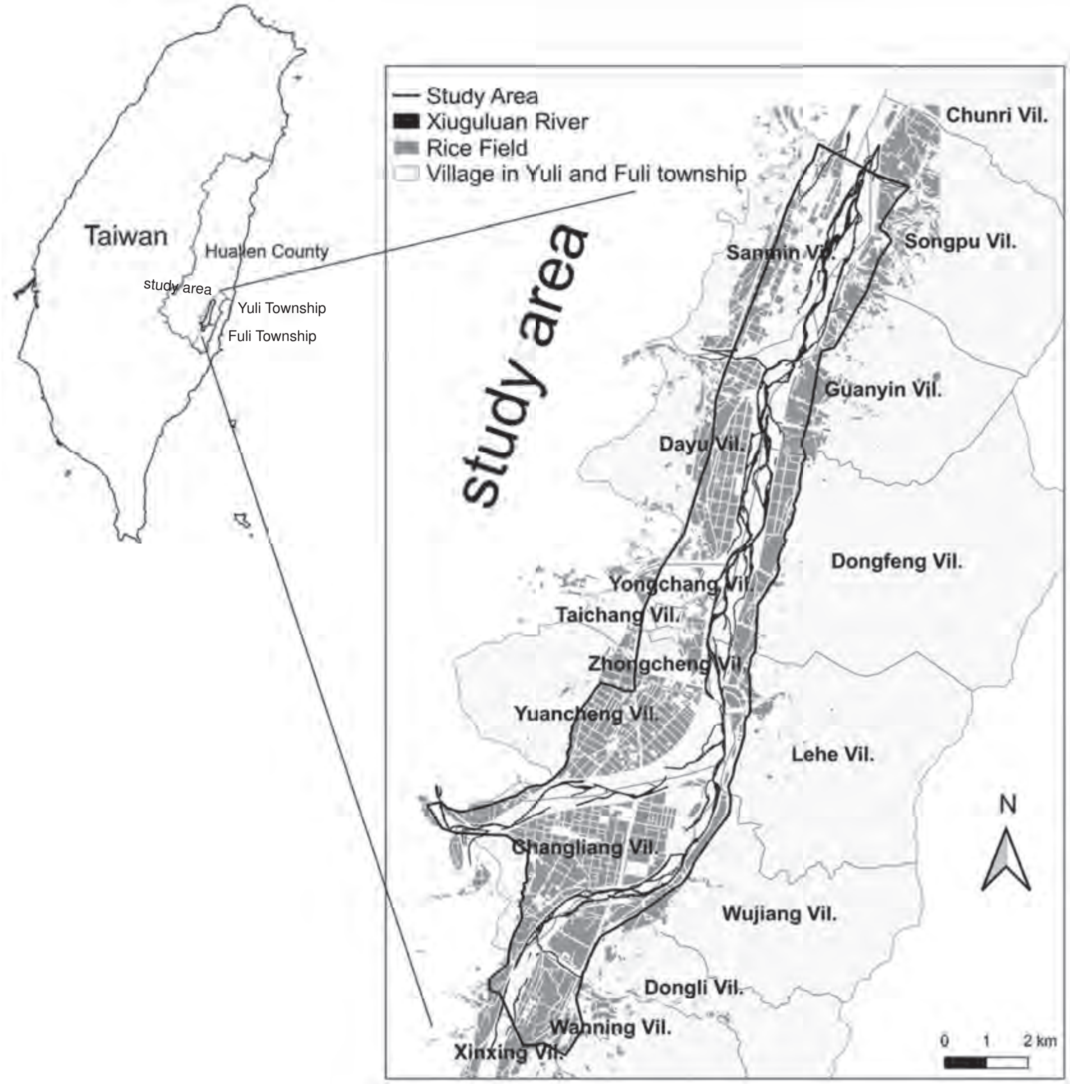

圖 1. 研究樣區位於花蓮縣玉里鎮至富里鄉境內的秀姑巒溪流域旁水稻產區。

Fig. 1. The study site was located in the rice producing area beside the Xiuguluan River basin in Yuli Township to Fuli Township, Hualien County, Taiwan.

(seedling height, cm)、(5) 田埂的草叢覆蓋比例 (grass coverage, %)、(6) 田埂的草叢高度 (grass height, cm)、(7) 灌叢覆蓋比例 (shrub coverage, %) 及 (8) 灌叢高度 (shrub height, cm)。

統計分析

使用廣義線性模型 (generalized linear model; GLM)，檢驗 9 項地景結構因子以及 8 項微棲地因子。選擇 binomial distribution (log link function) 分析地景結構因子與花嘴鴨有使用 (1) 與未使用 (0) 水稻田的關係。有使用的水稻田為實際調查到有花嘴鴨的水稻田，未使用的水稻田係利用 QGIS 劃設的研究樣區內隨機取樣 100 個水稻田。另外，選擇 Poisson distribution (log link function) 分析花嘴鴨的數量與水稻田微棲地因子的關係。GLM 在 R3.6.3 (R Core Team 2020) 環境下分析。

表 1.　本研究收集之環境變數及其說明。

Table 1.　Environmental variables in the study and their descriptions.

Environmental variable	Description
Landscape structure	
Water area ratio (He *et al*. 2011)[z]	Ratio of area occupied by water within 500 m buffer zone of each duck position
Vegetation area ratio (He *et al*. 2011)[z]	Ratio of area occupied by vegetation within 500 m buffer zone of each duck position
Mudflat area ratio (Lu 2019)[z]	Ratio of area occupied by mudflat within 500 m buffer zone of each duck position
Built area ratio (Lu 2019)[z]	Ratio of area occupied by building within 500 m buffer zone of each duck position
Road area ratio (Lu 2019)[z]	Ratio of area occupied by road within 500 m buffer zone of each duck position
Road density (Lu 2019)[z]	Ratio of total length of road network within 500 m buffer zone of each duck position ($km\ km^{-2}$)
Road adjacency (Lu 2019)[z]	Number of sides of surveyed paddy field adjacent to roads
Distance to the nearest building (building distance) (He *et al*. 2011)[z]	Linear distance in m from the duck to the nearest edge of building
Distance to the nearest river or irrigation channel with width > 3 m (waterway distance)[y]	Linear distance in m from the duck to the nearest edge of river or irrigation channel with width > 3 m
Micro habitat	
Maximum water depth[y]	The maximum water depth in cm from ten random positions of each surveyed paddy field block
Average water depth (Ma *et al*. 2010)[z]	The average water depth in cm from ten random positions of each surveying paddy field block
Smooth or unsmooth[y]	The difference of maximum and minimum water depth above 5 cm was determined as unsmooth in the paddy block
Seedling height[y]	Seedling height in cm in each survey field block
Grass height (Ma *et al*. 2010)[z]	Grass height in cm in the ridge of paddy field
Grass coverage (Ma *et al*. 2010)[z]	Percentage of grass coverage in the ridge of paddy field
Shrub height (Ma *et al*. 2010)[z]	Shrub height in cm in the ridge of paddy field
Shrub coverage (Ma *et al*. 2010)[z]	Percentage of shrub coverage in the ridge of paddy field

[z] Environmental variables collected were based on the paper review.
[y] Environmental variables collected were based on the field observation.

結果

在 2020 年 2 月期間調查花蓮縣玉里鎮與富里鄉的秀姑巒溪兩側水稻田花嘴鴨的分布，共調查 212 塊水稻田，記錄 603 隻次花嘴鴨在水稻田。刪除高度相關的協變量 ($r > 0.5$) 後，以水域比例、建物比例、與馬路的接壤、與建築物的距離及與水道的距離等 5 項地景結構因子，進行有無花嘴鴨的二項式回歸分析。其最佳的模型中 [ΔAkaike information criterion corrected for small sample sizes (ΔAICc) = 0, Akaike weights (wi) = 0.213]，花嘴鴨的出現率與水道距離，以及建物比例呈現顯著負相關 (前者 $P < 0.001$，後者 $P < 0.01$，$N = 312$，表 2)，而與建物的距離呈現顯著正相關 ($P < 0.05$, $N = 312$，表 2)。以上顯示，花嘴鴨偏好離水道越近的水稻田區，且會趨避人工建築物 (圖 2)。微棲地因子在刪除高度相關協變量後，共有平均水深、農田平整與否、秧苗高度、草叢比例及高度、樹叢比例及高度等 7 項因子進行普瓦松回歸分析。其最佳的模型中 (ΔAICc = 0, wi = 0.099)，草叢高度與平均水深與花嘴鴨的分布數量有顯著正相關 (前者 $P < 0.001$，後者 $P < 0.01$，$N = 212$，表 2)，表明花嘴鴨對於水稻田中的水位深度與周圍隱蔽性有一定需求。從草叢高度與水深的造訪頻度分布圖中可看出，草叢高度在 20–30 cm 時，花嘴鴨造訪

表 2. 檢測地景結構因子對花嘴鴨的出現率，以及微棲地因子對花嘴鴨數量的最佳廣義線性模型之統計值。

Table 2. Statistics of the best generalized linear model (GLM) examining effects of landscape structure variables on frequency of occurrence of the Eastern spot-billed duck and micro habitat variables on the duck's abundance.

Coefficient	Estimate	Std. error	*z* value	Pr (> |*z*|)
Landscape structure				
GLM (formula = built area ratio + building distance + waterway distance)				
AICc^z = 264, wi = 0.213				
Intercept	2.79	0.43	6.47	$9.6 \times 10^{-11***}$
Built area ratio	-0.18	0.06	-2.98	0.003^{**}
Building distance	0.002	0.001	2.33	0.02^{*}
Waterway distance	-0.017	0.002	-7.66	$1.9 \times 10^{-14***}$
Micro habitat				
GLM (formula = average water depth + seedling height + shrub coverage + grass height)				
AICc = 803, wi = 0.099				
Intercept	0.23	0.17	1.34	0.18
Average water depth	0.08	0.02	3.10	0.002^{**}
Seedling height	0.013	0.0080	1.55	0.12
Shrub coverage	0.008	0.0050	1.63	0.10
Grass height	0.003	0.0007	4.31	0.00002^{***}

^{z} AICc: Akaike information criterion corrected for small sample sizes; wi: Akaike weights.
$^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

頻度最高，30–40 cm 次高 (圖 3)；水深在 3–6 cm 時，花嘴鴨造訪頻度最高 (圖 4)。

討論

地景結構因子回歸模型顯示，花嘴鴨偏好離河道或者寬度 > 3 m 灌溉渠道越近，且周圍建築物比例越低與距離人工建築物越遠的水稻田。依樣區內現地觀察，度冬的花嘴鴨大量聚集緊臨樣區水稻田旁的秀姑巒溪且有水之處，沿溪因水泥堤防少干擾，可能是良好的度冬棲息地。白天或晚上可見花嘴鴨從秀姑巒溪方向飛進鄰近兩側的水稻田覓食，可佐證花嘴鴨傾向選擇利用離河道近的水稻田。偏好選擇在河道附近的水稻田，可能因為河道是花嘴鴨經常利用的度冬場域 (Shin *et al*. 2016a)，選擇離河道越近的水稻田進行覓食或其他活動，越可能節省往返水稻田所耗能量。例如紅腹濱鷸 (*Calidris canutus*) 花費在往返休息地 (resting) 與覓食地 (foraging) 的能量不高，僅占每天能量花費的 10% (Piersma *et al*. 1993; Pasquier 2019)；黑腹濱鷸 (*Calidris alpina*) 的覓食地離休息地越遠，其密度越低 (Dias *et al*. 2006; Pasquier 2019)。

另外，本研究發現花嘴鴨偏好選擇在農業灌溉溝渠附近的水稻田上，惟目前對於農業灌溉水路如何被利用的研究尚不多 (Lawler 2001)。Foster *et al*. (1984) 指出，野鴨繁殖時會利用灌溉溝渠作為交通運輸要道，主要是由於灌溉溝渠的高度隱密性及其與天然濕地的高度連結性。而在本研究所調查的樣區裡，有些灌溉溝渠較為寬廣、水流平緩，內亦有植被覆蓋，可看見不少花嘴鴨停棲其中，應該是使用灌溉溝渠作為臨時的休息地。因此，除了交通運輸功能，推測較為寬廣的灌溉溝渠亦是花嘴鴨等水鳥的棲所。

花嘴鴨活動會選擇周圍建築物比例低且離人工建築物較遠的水稻田區域。人工濕地有較頻繁的人類活動，在有較多的人為干擾下，多數水鳥會避免選擇不合適的棲地例如道路和建築物 (King *et al*. 2010)。其他研究亦指出，建築物或道路對水鳥豐度或棲息地的選擇皆是負面的影響 (Amano *et al*. 2004; King *et al*. 2010; He *et al*. 2011)。在行為的適應上，許多水鳥中

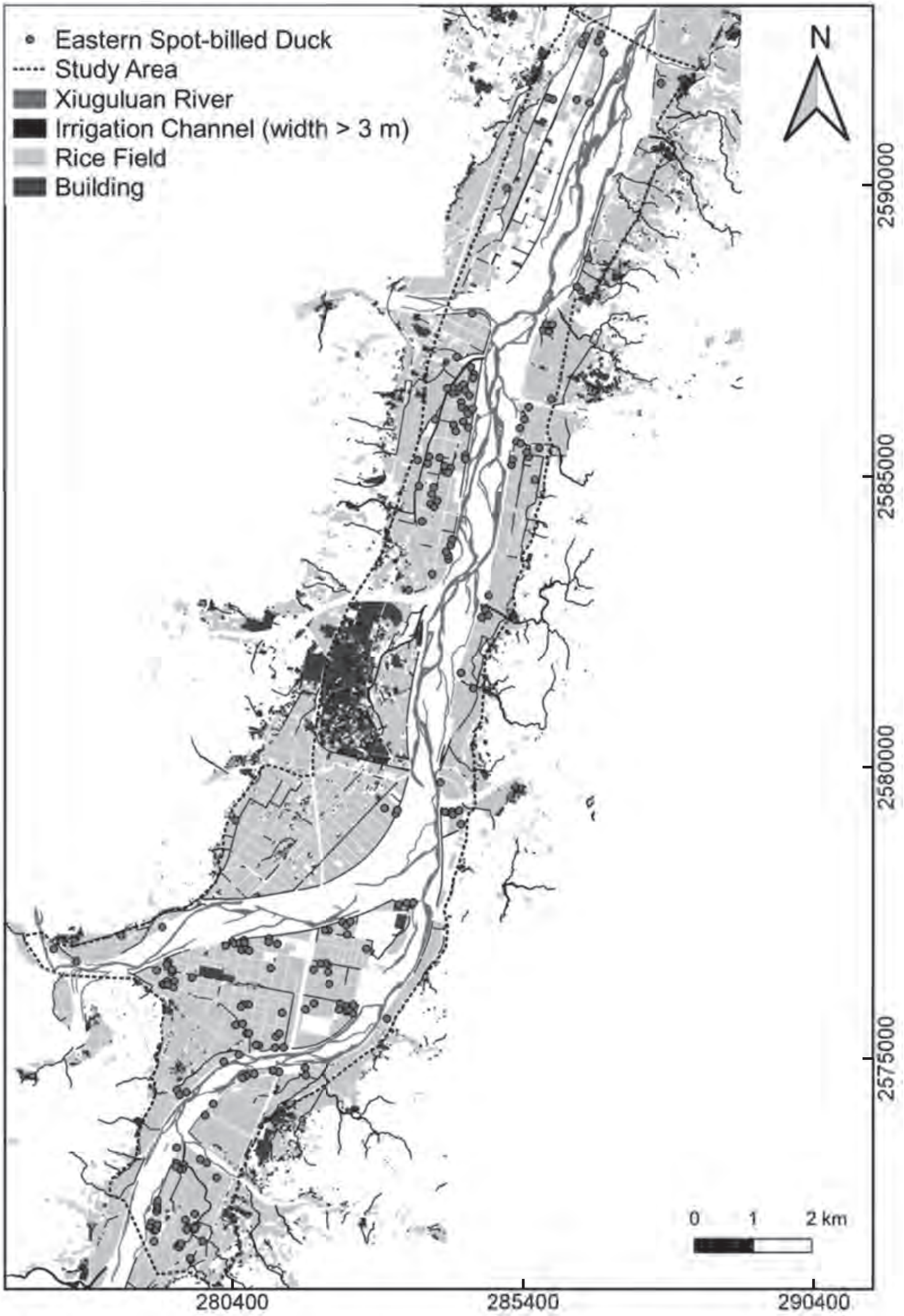

圖 2. 花嘴鴨在研究地區的分布。

Fig. 2. The distribution of the eastern spot-billed duck in the study area.

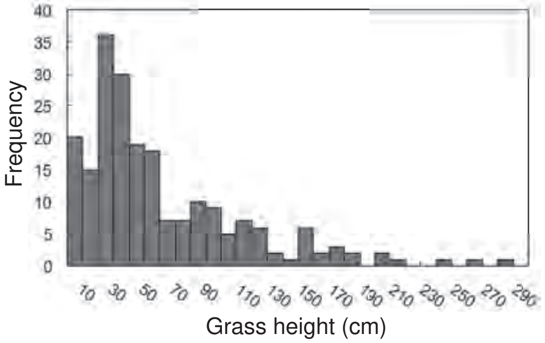

圖 3. 花嘴鴨利用水稻田的周圍草叢高度分布。

Fig. 3. The frequency distribution of grass heights in the rice paddies visited by the eastern spot-billed ducks.

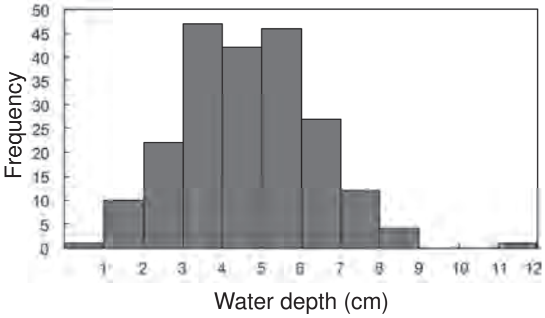

圖 4. 花嘴鴨利用水稻田的水深頻度分布。

Fig. 4. The frequency distribution of water depths in the rice fields visited by the eastern spot-billed ducks.

(包括花嘴鴨) 當人或車接近到一定距離時，牠們便會停下覓食開始警戒。若非常靠近時，牠們便會飛離所在地並盤旋尋找下一個覓食地 (Platteeuw & Henkens 1997; Rami & Norazlimi 2017)。人類干擾後進行的飛行，常常造成能量的額外消耗，而降低其適合度 (fitness)。

牠們在微棲地環境的選擇上，也可以看到人類干擾的效應，水稻田周邊草叢的高度越高，花嘴鴨的數量越多；且當草叢高度在 20–30 cm 時造訪頻度最高，30–40 cm 時次高。濕地周圍的植被除了可以提供植食性的水鳥食物 (例如種子與莖葉)，還可以提供隱蔽以避免人類的干擾，特別是在開闊平坦的水稻田區 (Hattori & Mae 2001; Ma *et al*. 2010)。水稻田周圍多被農用道路包圍作為當地農民交通通道，水鳥在交通流量高的田區覓食或棲息受一定程度的干擾 (Ma *et al*. 2010)。若水稻田周圍有植被的遮蔽來避免干擾，可能減少受人類活動干擾飛離所耗費的能量，應付每年換羽、遷移或繁殖所需的能量較為充裕，甚至可以降低個體死亡率 (Platteeuw & Henkens 1997; Goss-Custard *et al*. 2006; Stafford *et al*. 2014)。所以，即使在道路密度高區域的農田區塊，若有較高的草叢在其周圍，推測花嘴鴨亦較可能選擇進入。無論如何，花嘴鴨所在的水稻田周圍為高度人工化環境，又有人類活動干擾，牠們對水稻田所做的棲地選擇，皆可能影響飛回繁殖地的能量儲存或是生存率，最終影響到總族群量 (Rami & Norazlimi 2017)。

水深是另一項顯著影響花嘴鴨數量分布的微棲地因子。許多研究已指出水深對於水鳥選擇棲息地發揮了重大作用，是水鳥棲地選擇的重要變量 (Colwell & Taft 2000; Isola *et al*. 2000; Ma *et al*. 2010; Behney 2020)。水鳥的型態與攝食策略，決定其可利用之水深範圍，例如較長的脖子、喙和腳的大型水鳥較小型的水鳥，可以在天然濕地較深的水域覓食 (Pöysä 1983; Ma *et al*. 2010; Vanausdall & Dinsmore 2019)；小型水鳥使用的水深小於 5 cm，大型水鳥使用的水深為 5–11 cm。涉水鴨 (dabbling duck) 使用的水深可大於 20 cm，潛水水鳥所需水深大於 25 cm (Isola *et al*. 2000)。Ma *et al*. (2010) 歸納出大型涉水鴨在濕地活動的水深範圍為 5–30 cm。Elphick & Oring (1998) 在研究秋冬有淹水且普遍水深在 10–30 cm 之間的水稻田，綠頭鴨 (*Anas platyrhynchos*) 偏好 7–14 cm 的水稻田，尖尾鴨 (*Anas acuta*) 偏好 14–21 cm 的水稻田。花嘴鴨缺乏資料，但依其體型應與綠頭鴨相當，可能偏好 7–14 cm 的水深。在本研究中，花嘴鴨造訪頻度最高為 3–6 cm 的水深，比較其他涉水鴨偏好的水深範圍相對較淺，可能的原因是本研究調查期間水稻田普遍的水深在 1–8 cm 不超過剛插秧苗之高度。這時花嘴鴨進入水稻田主要取食秧苗下方未發芽的穀粒，即使水位很淺，這些可用的食物資源仍會吸引花嘴鴨進入水稻田利用 (Sesser *et al*. 2018)。

插秧後的水稻田淹水至 3 cm 時，花嘴鴨開始頻繁造訪。在現地的觀察，花嘴鴨在水稻田的覓食方式可依水深而有所不同，在水淺處

能夠行走啄食地面附近可利用的食物如稻田種子，若在水較深處，則以游泳方式濾食水面食物。由此比較，有水或無水的水稻田花嘴鴨都能夠利用。但花嘴鴨最主要覓食方式是用涉水方式，可能也是像綠頭鴨一樣以觸覺線索 (tactile cues) 濾食數公分的水面。以觸覺線索覓食的物種具有全視野，涉水覓食時可同時警戒周圍環境，相較於行走低頭啄食，如此能夠節省抬頭警戒的時間以提升覓食效率 (Guillemain *et al*. 2001, 2002)。因此，一旦水稻田開始淹水至 3 cm 時，可能便於花嘴鴨涉水覓食，推測這是花嘴鴨造訪變頻繁的原因之一。

本研究顯示水越深，花嘴鴨數量有上升趨勢，樣區記錄到花嘴鴨群聚最高的隻次數為 20 隻 (其最大水深為 7.8 cm)，其次為 14 隻 (其最大水深為 8 cm)。7–14 cm 可能為花嘴鴨偏好的水深。因此，在本調查水深 1–8 cm 的範圍內，當水位超過 7 cm 時，推測可能是其所偏好與能利用食物資源的最佳水位。再者，花嘴鴨是群聚型的水鳥，群聚有其生存上的好處，例如可以花較多時間覓食，較少時間警戒 (Pulliam 1973; Randler 2005; Boukhriss *et al*. 2007; Severcan & Yamaç 2011)，並稀釋掠食者的風險，符合 dilution and many eyes hypothesis 假說 (Hamilton 1971; Severcan & Yamaç 2011)。故當水位到達其偏好範圍，花嘴鴨便越會聚集在水稻田內棲息或覓食。

水鳥為農業系統提供諸多的生態系服務，例如在農作期間，稻稈的分解與雜草問題對水稻農民是很大的挑戰，但透過水鳥尤其是大型的涉水鴨，牠們的踩踏可以將稻稈壓扁、推入水下與併入泥土裡，藉此能增加泥土中微生物對稻稈的分解效率 (Bird *et al*. 2000; Brogi *et al*. 2015)。另外，涉水鴨在冬季主要是種子取食者 (Guillemain *et al*. 2002)，能降低雜草的種子種類 (從 38 降至 21 種) 及密度 (降低 90%) (Li *et al*. 2012)。又在整個稻米生長季期間，水稻與稻鴨共作 (integrated rice duck farming; IRDF) 對於雜草的抑制更明顯，因為牠們激起混濁的水而阻止雜草種子發芽，踩踏雜草幼苗或以幼苗為食 (Zhang *et al*. 2009; Furuno 2012; Brogi *et al*. 2015)。在樣區中，本研究觀察到日夜都有花嘴鴨在水稻田活動且時間相當長，例如 2 月記錄到花嘴鴨 05:40 天亮前進入水稻田至 09:00 仍在活動。在這長時間的活動中估計花嘴鴨對稻稈的分解，或者雜草的抑制應有相當的貢獻。建議未來有更多對花嘴鴨在水稻田的行為與對水稻田效益的研究，不僅可善加運用花嘴鴨提供的水田稻稈清除或雜草抑制等生態系統服務、減少農民成管理成本，更可促進水田生態系統的永續經營。

結論

從維護生態系服務價值的觀點而言，本研究發現鄰近河道或較寬廣灌溉水圳的水稻田較受花嘴鴨偏好，在水鳥保護上具有較高價值。因此，建議農政單位可考慮在河川邊緣或農用水路邊緣提供補助 (棲地維護獎勵金)，鼓勵農民對花嘴鴨友好的水稻種植方式。針對這些農田提供維護重要棲地的生態服務給付，將可提高農民於休耕期間蓄水、提供水鳥使用，以及不使用除草劑、毒鼠藥、獸鋏、毒餌、鳥網等友善耕作方式的意願。未來亦可進一步將這些區域劃設為水稻田友善耕作的示範區，爭取更多農民認同及學習，若有更多的水道邊緣區域用作水鳥的避難所，應可擴大本地對全球水鳥保護的貢獻。在農民對農田的管理方面，插秧期水稻田水位深度在 3–6 cm 是花嘴鴨偏好利用的範圍，建議水鳥度冬期間，農民將冬季休耕的水稻田貯水 3 cm 以上，可以提供花嘴鴨作為中途停留站或度冬地。並且在水稻田周圍保留一些高於 20 cm 的植被，可以增加花嘴鴨對水稻田的利用率。相反的，水鳥度冬期間仍然耕作的水稻田，建議插秧期水深保持在 3 cm 以下，周圍維持 20 cm 以下的低矮植被，減少花嘴鴨利用水稻田的機會，可減輕農民的損失。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 108 農科-10.4.1-森-G1 科技計畫補助，以及兩位審查者提供寶貴建議，特此一併感謝。

引用文獻

Allen, A. W. 1987. Habitat Suitability Index Models: Mallard (Winter Habitat, Lower Mississippi Valley). U.S. Fish and Wildlife Service. Bailey's Crossroads, VA. 37 pp.

Amano, T., K. Ushiyama, G. Fujita, and H. Higuchi. 2004. Factors affecting rice grain density unconsumed by white-fronted geese in relation to wheat damage. Agric. Ecosyst. Environ. 102:403–407. doi:10.1016/j.agee.2003.09.021

Amano, T., Y. Kusumoto, Y. Tokuoka, S. Yamada, E. Y. Kim, and S. Yamamoto. 2008. Spatial and temporal variations in the use of rice-paddy dominated landscapes by birds in Japan. Biol. Conserv. 141:1704–1716. doi:10.1016/j.biocon.2008.04.012

Baasch, D. M., P. D. Farrell, A. T. Pearse, D. A. Brandt, A. J. Caven, M. J. Harner, G. D. Wright, and K. L. Metzger. 2019. Diurnal habitat selection of migrating whooping crane in the Great Plains. Avian Conserv. Ecol. 14:6.

Beatty, W. S., E. B. Webb, D. C. Kesler, A. H. Raedeke, L. W. Naylor, and D. D. Humburg. 2014. Landscape effects on mallard habitat selection at multiple spatial scales during the non-breeding period. Landsc. Ecol. 29:989–1000. doi:10.1007/s10980-014-0035-x

Behney, A. C. 2020. The influence of water depth on energy availability for ducks. J. Wildl. Manage. 84:436–447. doi:10.1002/jwmg.21811

Bird, J. A., G. S. Pettygrove, and J. M. Eadie. 2000. The impact of waterfowl foraging on the decomposition of rice straw: Mutual benefits for rice growers and waterfowl. J. Appl. Ecol. 37:728–741. doi:10.1046/j.1365-2664.2000.00539.x

BirdLife International. 2018. *Anas zonorhyncha*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22736042A132303839. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22736042A132303839.en (visit on 05/05/2020)

Boukhriss, J., S. Selmi, A. Béchet, and S. Nouira. 2007. Vigilance in greater flamingos wintering in Southern Tunisia: Age-dependent flock size effect. Ethology 113:377–385. doi:10.1111/j.1439-0310.2007.01335.x

Brogi, A., C. A. Pernollet, M. Gauthier-Clerc, and M. Guillemain. 2015. Water fowl foraging in winter-flooded ricefields: Any agronomic benefits for farmers? Ambio 44:793–802. doi:10.1007/s13280-015-0678-0

Chen, C. C., C. C. Liao, C. C. Wu, and C. M. Tsai. 2019. 2018–2019 bird survey and monitoring in two important wetlands: Longluantan and Nanren Lake. Kenting National Park research report. Kenting National Park Headquarters, Pingtung County, Taiwan. https://ws.ktnp.gov.tw/Download.ashx?u=LzAwMS9VcGxvYWQvMjQ1L3JlbGZp-bGUvNjczMi8xMTE4MjgvZWI0YmJiY2EtYzB-kYy00MzU4LWIzMDEtMzM3NWY2Y2Q2OD-k0LnBkZg%3D%3D&n=MTA3LTEwOOWivuS-4gemHjeimgea%2FleWcsOmzpemhnueglOeptuio-iOeVq1%2FntZDmoYjloLHlkYoucGRm&icon=.pdf (visit on 04/20/2020) (in Chinese with English abstract)

Colwell, M. A. and O. W. Taft. 2000. Waterbird communities in managed wetlands of varying water depth. Waterbirds 23:45–55.

Czech, H. A. and K. C. Parsons. 2002. Agricultural wetlands and waterbirds: A review. Waterbirds 25:56–65.

Dias, M. P., J. P. Granadeiro, M. Lecoq, C. D. Santos, and J. M. Palmeirim. 2006. Distance to high-tide roosts constrains the use of foraging areas by dunlins: Implications for the management of estuarine wetlands. Biol. Conserv. 131:446–452. doi:10.1016/j.biocon.2006.02.020

Elphick, C. S. and L. W. Oring.1998. Winter management of Californian rice fields for waterbirds. J. Appl. Ecol. 35:95–108. doi:10.1046/j.1365-2664.1998.00274.x

Elphick, C. S. 2010. Why study birds in rice fields? Waterbirds (Spec. Pub.) 33:1–7. doi:10.1675/063.033.s101

Elphick, C. S., P. Baicich, K. C. Parsons, M. Fasola, and L. Mugica. 2010. The future for research on waterbirds in rice fields. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:231–243. doi:10.1675/063.033.s117

Fasola, M. and A. Brangi. 2010. Consequences of rice agriculture for waterbird population size and dynamics. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:160–166. doi:10.1675/063.033.s112

Ferrero, A. and A.Tinarelli. 2008. Rice cultivation in the E.U. ecological conditions and agronomical practices. p.1–24. *in*: Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies: Theory and Practice. (Capri, E. and D. Karpouzas, eds.) Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 266 pp. doi:10.1016/B978-044453087-5.50002-3

Foster, J. H., W. E. Tillett, W. L. Myers, and J. C. Hoag. 1984. Columbia Basin wildlife/irrigation development study. Report No. REC-ERC-83-6. U.S. Department of Interior, Bureau of Reclamation, Ephrata, Washington, USA. https://www.usbr.gov/

tsc/techreferences/rec/REC-ERC-83-06.pdf (visit on 05/04/2020)

Fox, A. D. and J. Madsen. 1997. Behavioural and distributional effects of hunting disturbance on waterbirds in Europe: Implications for refuge design. J. Appl. Ecol. 34:1–13. doi:10.2307/2404842

Furuno, T. 2012. The One-Duck Revolution: Why Asia Does Not Do European Farming. Takao Furuno. Morrisville, NC. 128 pp.

Giosa, E., C. Mammides, and S. Zotos. 2018. The importance of artificial wetlands for birds: A case study from Cyprus. PLoS One 13:e0197286. doi:10.1371/journal.pone.0197286

Goss-Custard, J. D., P. Triplet, and A. D. West. 2006. Critical thresholds of disturbance by people and raptors in foraging wading birds. Biol. Conserv. 127:88–97.

Guillemain, M., P. Duncan, and H. Fritz. 2001. Switching to a feeding method that obstructs vision increases head-up vigilance in dabbling ducks. J. Avian Biol. 32:345–350.

Guillemain, M., G. R. Martin, and H. Fritz. 2002. Feeding methods, visual fields and vigilance in dabbling ducks (Anatidae). Funct. Ecol. 16:522–529. doi:10.1046/j.1365-2435.2002.00652.x

Hamilton, W. D. 1971. Geometry for the selfish herd. J. Theor. Biol. 31:295–311. doi:10.1016/0022-5193(71)90189-5

Hattori, A. and S. Mae. 2001. Habitat use and diversity of waterbirds in a coastal lagoon around Lake Biwa, Japan. Ecol. Res. 16:543–553. doi:10.1046/j.1440-1703.2001.00416.x

He, P., D. J. Kong, Q. Liu, H. Z. Yu, J. L. Zhao, and X. J. Yang. 2011. Roosting-site characteristics of wintering black-necked cranes (*Grus nigricollis*) at Napahai, Yunnan. Zool. Res. 32:150–156. (in Chinese with English abstract) doi:10.3724/SP.J.1141.2011.02150

Herbert, J. A., A. Chakraborty, L. W. Naylor, W. S. Beatty, and D. G. Krementz. 2018. Effects of landscape structure and temporal habitat dynamics on wintering mallard abundance. Landsc. Ecol. 33:1319–1334. doi:10.1007/s10980-018-0671-7

Hollander, F. A., H. V. Dyck, G. S. Martin, and N. Titeux. 2011. Maladaptive habitat selection of a migratory passerine bird in a human-modified landscape. PLoS One 6:e25703. doi:10.1371/journal.pone.0025703

Ibáñez, C., A. Curcó, X. Riera, I. Ripoll, and C. Sánchez. 2010. Influence on birds of rice field management practices during the growing season: A review and an experiment. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:167–180. doi:10.1675/063.033.s113

Isola, C. R., M. A. Colwell, O. W. Taft, and R. J. Safran. 2000. Interspecific differences in habitat use of shorebirds and waterfowl foraging in managed wetlands of California's San Joaquin Valley. Waterbirds 23:196–203.

Johnson, D. H. 1980. The comparison of usage and availability measurements for evaluating resource preference. Ecology 61:65–71. doi:10.2307/1937156

Kaminski, R. M. and J. Elmberg. 2014. An introduction to habitat use and selection by waterfowl in the northern hemisphere. Wildfowl. (Spec. Issue) 4:9–16

King, S., C. S. Elphick, D. Guadagnin, O. Taft, and T. Amano. 2010. Effects of landscape features on waterbird use of rice fields. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:151–159. doi:10.1675/063.033.s111

Lawler, S. P. 2001. Rice fields as temporary wetlands: A review. Isr. J. Zool. 47:513–528. doi:10.1560/X7K3-9JG8-MH2J-XGX1

Li, S. S., S. H. Wei, R. L. Zuo, J. G. Wei, and S. Qiang. 2012. Changes in the weed seed bank over 9 consecutive years of rice-duck farming. Crop Prot. 37:42–50. doi:10.1016/j.cropro.2012.03.001

Li, C., L. Zhou, L. Xu, N. Zhao, and G. Beauchamp. 2015. Vigilance and activity time-budget adjustments of wintering hooded cranes, *Grus monacha*, in human-dominated foraging habitats. PLoS One 10:e0118928. doi:10.1371/journal.pone.0118928

Longoni, V. 2010. Rice fields and waterbirds in the Mediterranean region and the Middle East. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:83–96. doi:10.1675/063.033.s106

Lu, L. C. 2019. Effects of urban sprawl and habitat management on avian diversity and habitat preferences in fallow rice paddies of Yilan. Master Thesis, Graduate Institute of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 71 pp. (in Chinese with English abstract) doi:10.6342/NTU201902577

Ma, Z., Y. Cai, B. Li, and J. Chen. 2010. Managing wetland habitats for waterbirds: An international perspective. Wetlands 30:15–27. doi:10.1007/s13157-009-0001-6

Maclean, J. L., D. C. Dawe, B. Hardy, and G. P. Hettel. 2002. Rice Almanac: Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth. 3rd ed. CABI Publ., Wallingford, UK. 253 pp. doi:10.1079/9780851996363.0000

Mayer, M., D. Natusch, and S. Frank. 2019. Water body type and group size affect the flight initiation distance of European waterbirds. PLoS One 14:e0219845. doi:10.1371/journal.pone.0219845

Pasquier, R. F. 2019. Birds in Winter: Surviving the Most Challenging Season. Princeton University Press. Princeton, NJ. 304 pp.

Pearse, A. T., M. J. Harner, D. M. Baasch, G. D. Wright, A. J. Caven, and K. L. Metzger. 2017a. Evaluation of nocturnal roost and diurnal sites used by Whooping Cranes in the Great Plains, United States. Open File Report 2016-1209. U.S. Geological Survey, Reston, VA.

Pearse, A. T., G. L. Krapu, and D. A. Brandt. 2017b. Sandhill crane roost selection, human disturbance, and forage resources. J. Wildl. Manag. 81:477–486. doi:10.1002/jwmg.21215

Piersma, T., R. Hoekstra, A. Dekinga, A. Koolhaas, P. Wolf, P. Battley, and P. Wiersma. 1993. Scale and intensity of intertidal habitat use by knots *Calidris canutus* in the western Wadden Sea in relation to food, friends and foes. Neth. J. Sea Res. 31:331–357. doi:10.1016/0077-7579(93)90052-T

Platteeuw, M. and R. J. H. G. Henkens. 1997. Possible impacts of disturbance to waterbirds: Individuals, carrying capacity and populations. Wildfowl 48:225–236.

Pöysä, H. 1983. Resource utilization pattern and guild structure in a waterfowl community. Oikos 40:295–307. doi:10.2307/3544594

Pulliam, H. R. 1973. On the advantages of flocking. J. Theor. Biol. 38:419–422. doi:10.1016/0022-5193(73)90184-7

QGIS.org. 2020. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://qgis.osgeo.org (visit on 03/10/2020)

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.r-project.org (visit on 03/17/2020)

Rami, R. and N. A. Norazlimi. 2017. The effects of disturbance on the abundance and foraging behaviour of shorebirds and waterbirds in the tropical mudflat areas. Sains Malays. 46:365–372. doi:10.17576/jsm-2017-4603-02

Randler, C. 2005. Coots *Fulica atra* reduce their vigilance under increased competition. Behav. Processes 68:173–178. doi:10.1016/j.beproc.2004.12.007

Sesser, K. A., M. Iglecia, M. E. Reiter, K. M. Strum, C. M. Hickey, R. Kelsey, and D. A. Skalos. 2018. Waterbird response to variable-timing of drawdown in rice fields after winter-flooding. PLoS One 13:e0204800. doi:10.1371/journal.pone.0204800

Severcan, Ç. and E. Yamaç. 2011. The effects of flock size and human presence on vigilance and feeding behavior in the Eurasian Coot (*Fulica atra* L.) during breeding season. Acta Ethol. 14:51–56. doi:10.1007/s10211-010-0089-y

Severinghaus, L. L., T. S. Ding, W. H. Fang, W. H. Lin, M. C. Tasi, and C. W. Yen. 2012. The Avifauna of Taiwan. 2nd ed. Vol. 1. Forest Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 663 pp. (in Chinese)

Shin, Y. U., M. S. Shin, H. S. Lee, S. W. Han, S. M. Jung, and H. S. Oh. 2016a. A study on spot-billed ducks' daily habitat use pattern during wintering period in Korea11. Korean J. Environ. Ecol. 30:328–334. (in Korean with English abstract) doi:10.13047/KJEE.2016.30.3.328

Shin, Y. U., M. S. Shin, H. S. Lee, Y. M. Kang, O. K. Moon, H. S. Park, and H. S. Oh. 2016b. Study for habitat usage of spot-billed duck in Korea, using GPS-Mobile telemetry (WT-200)1a. Korean J. Environ. Ecol. 30:146–154. (in Korean with English abstract) doi:10.13047/KJEE.2016.30.2.146

Shyu, B. S. and G. C. Lin. 1993. The investigation of ecology on the Hsiukuluan river and prevention studies on the damage of rice from wild ducks. Bull. Hualien Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 9:35–44. (in Chinese)

Stafford, J. D., R. M. Kaminski, and K. J. Reinecke. 2010. Avian foods, foraging, and habitat conservation in world rice fields. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:133–150. doi:10.1675/063.033.s110

Stafford, J. D., A. K. Janke, M. J. Anteau, A. T. Pearse, A. D. Fox, J. Elmberg, J. N. Straub, M. W. Eichholz, and C. Arzel. 2014. Spring migration of waterfowl in the northern hemisphere: A conservation perspective. Wildfowl. (Spec. Issue) 4:70–85.

Vallon, M., C. Dietzen, S. Laucht, and J. D. Ludwigs. 2018. Focal species candidates for pesticide risk assessment in European rice fields: A review. Integr. Environ. Assess. Manag. 14:537–551. doi:10.1002/ieam.4054

Vanausdall, R. A. and S. J. Dinsmore. 2019. Habitat associations of migratory waterbirds using restored shallow lakes in Iowa. Waterbirds 42:135–153. doi:10.1675/063.042.0201

Velasquez, C. R. 1992. Managing artificial saltpans as a waterbird habitat: Species' responses to water level manipulation. Col. Waterbirds 15:43–55. doi:10.2307/1521353

Wood, C., Y. Qiao, P. Li, P. Ding, B. Lu, and Y. Xi. 2010. Implications of rice agriculture for wild birds in China. Waterbirds (Spec. Pub.) 33:30–43.

Zhang, J. E., R. Xu, X. Chen, and G. Quan. 2009. Effects of duck activities on a weed community under a transplanted rice-duck farming system in southern China. Weed Biol. Manag. 9:250–257. doi:10.1111/j.1445-6664.2009.00346.x

Habitat Selection of the Eastern Spot-billed Duck (*Anas zonorhyncha*) in Rice Paddies during the Seedling Transplanting Period

Mei-Jhu Hong[1], Shih-Han Hsu[2], Shin-Han Tseng[3], and Chao-Nien Koh[4,*]

Abstract

Hong, M. J., S. H. Hsu, S. H. Tseng, and C. N. Koh. 2021. Habitat selection of the eastern spot-billed duck (*Anas zonorhyncha*) in rice paddies during the seedling transplanting period. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):54–66.

Taiwan is an important winter spot for waterbirds. Among them, the eastern spot-billed duck (*Anas zonorhyncha* Swinhoe) migrates to Taiwan for a large amount from autumn to winter every year. However, area of natural wetlands in Taiwan is decreasing, and many ducks coming to Taiwan for winter turn to use rice paddies. Recently, rice paddies have become a shelter for the eastern spot-billed duck in winter, in addition to the purpose of food production. However, the ducks are not welcomed or even driven by farmers because they affect the growth of rice. At present, there is a lack of friendly method to manage both rice paddies and the ducks. The purpose of this study is to explore ways to mitigate conflicts between rice farmers and the ducks based on the duck's habitat use. It is hoped that rice paddies serve the dual purpose of providing food production and functioning as man-made wetlands that harbor the ducks. In February 2020, we surveyed 212 paddy fields used by the ducks in the rice transplanting period around Xiuguluan River in Hualien County. Data of 9 landscape structure variables and 8 microhabitat variables were collected for each of the fields. It was found that the eastern spot-billed duck chose a rice paddy closer to the river or near the irrigation channel, possibly to save energy on flying between foraging and resting sites. In addition, the ducks seemed to avoid buildings and chose a site with a low built area ratio, which might reflect the pressure of human interference. From the perspective of micro habitat choice, the ducks may choose the paddy field covered by higher grass, and it was found that the most commonly chose grass height around the paddy field was 20–40 cm. This choice may also be related to human interference. Water depth is another important determining factor. The number of the ducks gradually increased with the increasing water depth of the rice paddy during the transplanting period, and 3–6 cm was the most frequently visited water depth range. Based on the result of the preference of the ducks on the paddy field, it suggests that paddy fields cultivated during the winter, kept the water depth below 3 cm during the seedling transplanting period, and maintained surrounding vegetation height below 20 cm would reduce the utilization of paddy fields by the duck. Paddy fields adjacent to Xiuguluan River or irrigation channels with a width greater than 3 m are suggested suitable for waterbird protection. It is recommended the government to consider providing subsidies on waterbird protection in this area so as to encourage the rice farmers to manage their paddies in a duck-friendly way.

Key words: Landscape ecology, Farmland ecosystem, Irrigation channel, Human disturbance, Water depth.

Received: July 20, 2020; Accepted: December 15, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: nien@tfri.gov.tw
[1] Research Assistant, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
[2] Researcher, Observer Ecological Consultant Co., Ltd., Taipei, Taiwan, ROC.
[3] Researcher, Hanlin Ecological Consultant Agency, Yunlin County, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(1):67–79 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202103_70(1).0006

研究報告

豇豆微斑駁病毒之鑑定與生物特性分析

鄭櫻慧 [1,*] 陳金枝 [1] 簡蘭懿 [2] 張清安 [3]

摘要

鄭櫻慧、陳金枝、簡蘭懿、張清安。2021。豇豆微斑駁病毒之鑑定與生物特性分析。台灣農業研究 70(1):67–79。

採集自嘉義縣新港鄉的長豇豆及南投縣草屯鎮的敏豆疑似感染病毒樣本，經過分離得到 *Calavirus* 屬的豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 的長豇豆分離株 (CpMMV-V) 及敏豆分離株 (CpMMV-P)，以機械接種回接長豇豆及敏豆均可以感染並引起與田間相似葉片斑駁的病徵。2 分離株接種其他豆科作物時，以植株全株來看無明顯矮化或發育不良，但從葉片可觀察到斑駁與黃化斑點等輕微病徵。採自病株種子以出芽測試未測得 CpMMV 藉由種子傳播的現象，電子顯微鏡則可觀察到長桿狀病毒顆粒。抽取植物之總量 RNA，以 potyviruses 簡併式引子 (HRP5/dT) 進行反轉錄聚合酵素連鎖反應，意外擴增出約 1 Kb 的 DNA 產物，定序分析並與登錄於 GenBank 上的序列比對，此段 DNA 含括豇豆微斑駁病毒的部分鞘蛋白基因至基因體 3’ 端。再次以專一性引子擴增、選殖及定序分析完整鞘蛋白基因，長豇豆分離株之鞘蛋白基因 (JX070669) 與敏豆分離株 (JX020701) 之鞘蛋白基因具有 88.9% 核苷酸相同度與 97.6% 胺基酸相同度，與網站上其他 CpMMV 鞘蛋白基因比較，核苷酸相同度介於 98.7–75.7%，胺基酸相同度介於 97.9–91.3% 之間。部分純化病毒懸浮液再以 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 純化病毒的鞘蛋白，經免疫白兔製備抗血清，其抗體可應用於西方漬染法及酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測。因此，乃進行田間偵測調查，發現 CpMMV 常見危害台灣中部地區栽培之敏豆。由於粉蝨為台灣常見害蟲，其媒介傳播之 CpMMV 除了危害長豇豆及敏豆以外，是否危害其他豆科作物尚待更多調查。

關鍵詞：豇豆微斑駁病毒、鞘蛋白、抗血清。

前言

長豇豆又名菜豆、豆角、筷豆，學名為 *Vigna unguiculata* subsp. Sequipedalis，英名為 asparagus bean、yard-long bean，原產於印度，具耐熱、耐濕特性，營養價值高。敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 又稱菜豆、雲豆、四季豆等，原產於中美洲，南北美洲一帶自古即有栽培，現由中美洲到日本北海道皆有種植 (Kuo 1995)。根據行政院農業委員會統計年報 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx)，2018 年長豇豆種植面積超過 920 ha，產值 430,359 千元，以屏東縣、高雄市及雲林縣為主要產區。敏豆種植面積超過 1,414 ha，產值 1,086,016 千元，以南投縣、屏東縣及高雄市為主要產區。台灣長豇豆的主要病害有病毒病、白粉病及煤黴病，次要病害有立枯病、萎凋病、白絹病、銹病、濕腐病、炭疽病及根瘤線蟲。敏豆主要病害有疫病、角斑病、白絹病、銹病及炭疽病等 (Tzeng 2019)。危害長豇豆的病毒有 3 種，豆類普通嵌紋病毒 (bean common mosaic virus; BCMV)、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV) 及豇豆蚜媒嵌紋病毒 (cowpea aphid-borne mosaic virus;

投稿日期：2020 年 11 月 24 日；接受日期：2020 年 12 月 23 日。
[*] 通訊作者：yhcheng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 朝陽科技大學生化科技研究所教授。台灣 台中市。

CAMV)，其中以 BCMV、CMV 較為常見。敏豆則只有 CMV 危害紀錄。BCMV、CMV 可藉由種子、人為摘心造成的機械傷口及蚜蟲媒介傳播。長豇豆單獨感染 BCMV 時，病徵輕微，但複合感染 BCMV 及 CMV 時，呈現葉片皺縮、嵌紋、植株矮化及豆莢變形等病徵，影響產量甚鉅 (Chang 1983)，種植「無病毒健康種子繁殖體系」所生產的種子可大幅降低病毒病害發生 (Chang *et al*. 1994)。

豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 首次在印度東部加納的豇豆被發現 (Brunt & Kenten 1973)，之後廣泛分布於東部地區的加納與非洲西部，此病毒可自然感染其他豆科作物，如花生 (*Arachis hypogaea* L.)、大豆 (*Glycine max* L.)、綠豆 (*Vigna mungo* L.)、敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、長豇豆 (*Vigna unguiculata* subsp. Sequipedalis) 和蠶豆 (*Vicia faba* L.)，以及其他科別作物如：番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、菸草 (*Nicotiana clevelandii* Gray) 與木瓜 (*Carica papaya* L.) (Brunt & Philips 1981; Thouvenel *et al*. 1982; Anno-Nyako1986; Mink & Keswani 1987; Demski & Kuhn 1989; Reddy 1991; Rodriguez Pardina *et al*. 2004; Brito *et al*. 2012; Mumo *et al*. 2020) 等。東南亞地區的大豆與花生上也曾發現感染 CpMMV (Iwaki *et al*. 1982; Iizuka *et al*. 1984; Antignus & Cohen 1987; Mali & Nirmal 1987; Shahraeen 1989; Reddy 1991; Yadav *et al*. 2013)。CpMMV 屬於 *Flexiviridae* 科，*Carlavirus* 屬。媒介昆蟲為煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* G.)，以非永續性方式傳播 (Iwaki *et al*. 1982; Muniyappa & Reddy 1983; Jeyanandarajah & Brunt 1993; Rosario *et al*. 2014; Zanardo & Carvalho 2017)。

台灣的長豇豆及敏豆也有發現 CpMMV 的報告 (Chang *et al*. 2013)，本研究將釐清 CpMMV 台灣分離株之寄主範圍，種傳特性，分析比對鞘蛋白序列，製備抗血清，並初步調查 CpMMV 在台灣發生情形。

材料與方法

病毒之分離與寄主範圍測定

2009 年從嘉義縣新港鄉採集到疑似病毒感染的長豇豆及南投縣草屯鎮採集的敏豆，酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測長豇豆樣本與 BCMV strain blackeye cowpea mosaic (BCMV-BlCM) 之抗血清反應，敏豆樣本則否。長豇豆樣本機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*)，產生不同的 2 種黃斑，7 d 左右出現的黃斑為 BCMV-BlCM 感染引起；另外，有 10 d 左右出現的模糊黃斑，將之接種於紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 產生清晰可見的黃斑。之後利用紅藜進行病毒分離，經過 3 次單斑分離得到病毒的長豇豆分離株 (CpMMV-V)。敏豆樣本機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 產生細小黃斑，以奎藜進行 3 次單斑分離得到病毒的敏豆分離株 (CpMMV-P)。將分離所得的 2 個病毒分離株保存於紅藜及奎藜，取黃色病斑之葉片置於 50% 甘油於 -20℃保存，作為後續研究之病毒來源。另外，接種於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)，作為寄主範圍測定之接種原。

測試寄主範圍時，感染 CpMMV 之 2 分離株之奎藜病葉以 0.05 M PBS 研磨成汁液，以機械接種分別於長豇豆 (*Vigna unguiculata* subsp. Sequipedalis)、敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、綠豆 (*Vigna radiate* L. R. Wilczek)、紅豆 [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi]、皇帝豆 (*Phaseolus lunatus* L.)、蠶豆 (*Vicia faba* L.)、豌豆 (*Pisum sativum* L.)、黃豆 (*Glycine max* L. Merril)、花豆 (*Phaseolus coccineus* L. var. *albonanus* Bailey) 與花生 (*Arachis hypogaea* L.) 共 10 種食用豆科作物進行測試，置於網室進行病徵觀察。接種植物則連續觀察 4 wk 並每週採取葉片，進行間接式酵素結合免疫吸附分析法 (indirect ELISA) (Clark & Adams 1977) 確認病毒之感染與否及病徵表現情形。接種試驗重複進行 3 次，發病率為 3 次的平均值。

種子帶毒之出芽測試

接種 CpMMV-V 的綠豆與長豇豆及 CpMMV-P 的紅豆與敏豆種植於網室內，待其開花結果，豆莢變褐色變乾後，收取其種子陰乾。逢機取出 4 種豆類種子各 100 顆，播種於網室內進行出芽試驗。發芽後之子葉與真葉分別進行兩次 ELISA 檢測，測試有無病毒感染。

電子顯微鏡觀察

使用陰染法 (negative stain) (Hall 1964)，將感染病毒之長豇豆或敏豆葉片各切一小片分別放在載玻片上，加一滴 2% 磷鎢酸 [phosphotungstic acid (PTA), pH 7.0]，以刀片切碎，再以毛細管吸取，滴於銅網 (300 mesh) 上，待乾燥後以電子顯微鏡觀察病毒粒子之形態。

病毒鞘蛋白之純化與抗血清製備

以 CpMMV-V 接種約 15 d 出現黃斑的奎藜葉片作為病毒純化材料，依 Gonsalves & Ishii (1980) 的方法略加修改進行純化。每克病葉加入 2 mL 0.5 M 磷酸萃取緩衝液 (phosphate extraction buffer，以下簡稱 PE 緩衝液) (pH 7.5) 以果汁機打碎，過濾後加入氯仿及酚 (各 0.5 mL g^{-1}) 淨化，經低速離心去除綠色殘渣。上清液加入 8% PEG6000，於 4℃下攪拌 30 min 後，經低速離心取其沉澱物，以 0.1 M PE 緩衝液 (pH 7.0) 懸浮，再經低速離心去除綠色殘渣。上清液加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl，攪拌後經低速離心，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝液懸浮。懸浮液以 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 分析，切下白色蛋白帶，以 PE 緩衝液析出，定量至 1 mg mL^{-1}，委外免疫白兔製備 50 mL 的抗血清。再以所得抗血清純化免疫球蛋白 G (immunoglobulin G; IgG)，濃度調整為 1 mg mL^{-1}，作為 ELISA (Clark & Adams 1977) 或 Western blotting (Gooderham 1984) 之用。

SDS 免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test)

依 Purcifull & Batchelor (1977) 及 Chang *et al*. (1990) 的方法進行，配置含有 0.5% SDS 及 1% NaN_3 之 0.8% agar，取 12 mL 倒入直徑 9 cm 之培養皿，凝固後以打孔器打孔，每孔直徑為 5 mm，每孔距離為 35 mm。之後依序將前述純化鞘蛋白委外免疫白兔製備之抗血清、CpMMV-V 與 CpMMV-P 之病葉汁液與未接種之植株汁液分別置於孔中，進行抗原與抗體反應 16 h，觀察抗血清與抗原反應。

ELISA

試驗參照 Clark & Adams (1977) 報告進行間接式酵素結合免疫吸附分析，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，取 200 µL 加入 EIA 反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 4℃冰箱 16 h 進行覆膜反應 (coating reaction)。然後以 1× PBST 緩衝液 (137.0 mM NaC1 + 1.5 mM KH_2PO_4 + 1.0 mM Na_2HPO_4 + 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次。其後加入 150 µL 不同濃度由自製抗血清純化的 IgG 後，放置在 37℃定溫箱反應 2 h。再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，每孔加入 120 µL 已溶於磷酸緩衝液 (137.0 mM NaC1 + 1.5 mM KH_2PO_4 + 1.0 mM Na_2HPO_4 + 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, USA)，置於 37℃之定溫箱中反應 2 h。最後，再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，再以 120 µL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP, Amresco, Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應後 20–30 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Mlolecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品的讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 供試之病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 µL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl

+ 10 mM KCl + 10 mM $MgCl_2$ + 1 mM EDTA + 30% glycerol + 6% SDS + 9% β-Mercaptoethanol + 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)，再以前述自製抗血清進行漬染反應 (Gooderham 1984)。

RNA 之抽取及反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-ploymerase chain reaction; RT-PCR)

取 100 mg 的病葉，利用總量 RNA 純化試劑組 (Total RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 之萃取，得到總量 RNA。病毒 RNA (viral RNA) 之抽取則取純化病毒以病毒 RNA 純化試劑組 (Viral RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行萃取。以純化所得之 RNA 進行 RT-PCR，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA，各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5/Pot1 (Pappu *et al*. 1998) 或比對 GenBank 登錄之 CpMMV 基因序列，設計位於鞘蛋白基因上游之專一性引子 (5’TATTTGACTGGGGAGTCTTTCA3’)/Pot1，RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中，設定反應程序為 50℃下進行反轉錄 30.0 min，94℃變性 1.5 min 後，進行 30 個 PCR 循環反應。在 94℃下變性 1.0 min，50℃下鍊合 1.5 min，72℃下聚合 2.0 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6.0 min。反應產物以 1.2% Agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 電泳，分析增幅產物之分子量。

基因選殖及定序分析

RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Genemark Co., Taichung City, Taiwan) 回收 DNA， 以 pGEM-T Cloning Kit (Promega Co., Madison, WI, USA) 進行選殖。篩選得到之選殖株抽取質體經限制酶 EcoRI 酶切確認選殖 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司進行，所得之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InfoMax Inc., Madison, WI, USA) 分析軟體與 GenBank 上已登錄之核苷酸序列進行分析比對，再以 MEGA (Molecular Evolution Genetic Analysis) version 7.0 (Kumar *et al*. 2018) 繪製親緣關係樹狀圖。

結果

病毒分離與寄主範圍測定

分離病毒時以罹病葉片汁液進行接種，在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 葉面出現黃色圓斑，奎藜 (*C. quinoa*) 葉面則出現模糊黃斑，因此以紅藜進行 3 次單斑分離病毒株。之後接種於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)，作為以下寄主範圍測定之接種原。單斑分離病毒株 CpMMV-V 及 CpMMV-P 回接長豇豆與敏豆，產生葉片斑駁病徵 (圖 1)。

CpMMV-V 及 CpMMV-P 都以圓葉菸草病葉為接種原，分別接種 10 種豆科作物，連續觀察病徵反應 4 wk 並配合間接式酵素結合免疫吸附反應測試病毒的感染之情形，CpMMV-V 及 CpMMV-P 寄主範圍測定結果如表 1。

比較分別接種 CpMMV-V 與 CpMMV-P 之供試植株，以植株全株來看無明顯矮化或發育不良等差異，但若從葉片個別比較可看到一些斑駁、黃化斑點與葉片略黃化等病徵產生。其中，在花豆、敏豆與黃豆葉片上以肉眼可觀察到黃化斑點與著綠不均，毛豆則是葉片上略帶斑駁，但大多數如在皇帝豆、蠶豆、紅豆與綠豆等葉片無明顯病徵。

將所有接種植株之葉片，透過 ELISA 檢測，觀察植株病徵情形。從結果顯示，發現 CpMMV-V 與 CpMMV-P 在花豆、敏豆、黃豆成功接種之感染率皆有 70% 以上，然而綠豆感染率為 58.1% 與 50.8% (表 1)。

接種 CpMMV-P 於紅豆、黃豆、皇帝豆、蠶豆、花生及豌豆，其成功接種比率皆優於 CpMMV-V；綠豆、長豇豆、敏豆及花豆則以 CpMMV-V 之接種率較高。由此數據，可知在 10 種供試植物中，以兩株分離株而言，敏豆之感受性最高也最佳，其次是花豆，最後

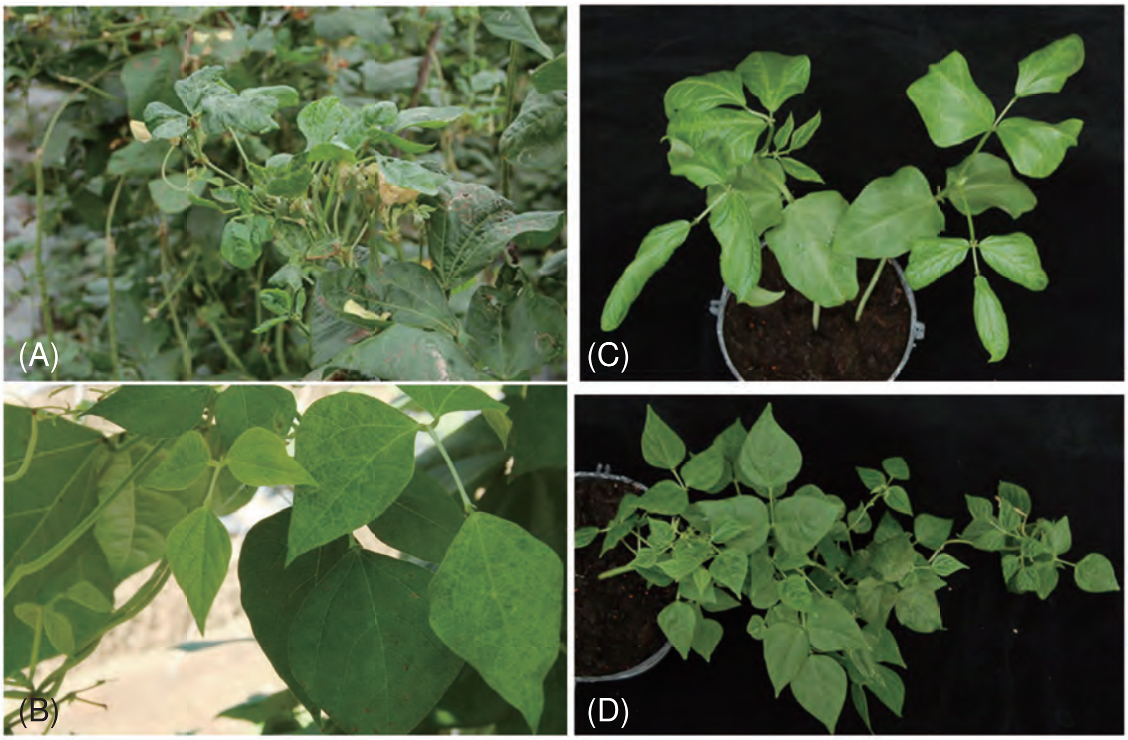

圖 1. 豇豆微斑駁病毒 (A) 長豇豆與 (B) 敏豆分離株於田間原始病徵及經過單離後回接原寄主 (C) 長豇豆與 (D) 敏豆之葉片斑駁等病徵。

Fig. 1. Severe symptoms caused by cowpea mild mottle virus (CpMMV) infecting (A) asparagus bean and (B) French bean were observed in the field. By mechanical inoculation, leaf mottle on (C) asparagus bean and (D) French bean were developed.

表 1. 豇豆微斑駁病毒兩分離株之豆科寄主作物接種測試。

Table 1. Reactions of the experimental Fabaceae crops by mechanically inoculated with two isolates V and P of cowpea mild mottle virus (CpMMV).

		CpMMV-V		CpMMV-P	
Tested plant	Chinese name	Sym[z]	DI[y]	Sym	DI
Vigna angularis (Willd.) Ohwi & H. Ohashi	紅豆	N	11.3	N	72.2
Vigna radiate L. R. Wilczek	綠豆	N	58.1	N	50.8
Vigna unguiculata subsp. *sequipedalis*	長豇豆	N	67.1	N	19.4
Phaseolus vulgaris L.	敏豆	CB	100.0	CB	93.3
Glycine max L. Merril	黃豆	CB	72.7	CB	90.5
Phaseolus lunatus L.	皇帝豆	N	41.1	N	65.3
Vicia faba L.	蠶豆	N	0	N	38.1
Phaseolus coccineus L. var. *albonanus* Bailey	花豆	CB	100.0	CB	77.8
*Arachis hypogea * L	花生	N	13.3	N	37.5
Pisum sativum L. subsp. *sativum*	豌豆	N	40.3	N	95.2

[z] Abbreviations used; N: no symptoms; CB: chlorotic blotches.
[y] Disease incidence (%): (number of infected plants/totally tested plants) × 100%. Each treatment contained 3 replications.

是黃豆。而單獨以 CpMMV-V 來看，感受性最高是以敏豆及花豆，其次是黃豆及長豇豆；而 CpMMV-P 則是以敏豆及豌豆最佳，其次黃豆，再其次是花豆及紅豆 (表 1)。

種子帶毒之出芽測試

以經過 RT-PCR 檢測後，確定為罹染 CpMMV-V 之綠豆與長豇豆或 CpMMV-P 之紅豆與敏豆植株作為留種之用。各取 100 顆採自病株種子進行出芽測試，置於網室至發芽後，採集發芽之子葉與真葉進行 2 次 ELISA 檢測，測試種子是否帶毒。

從子葉與真葉 2 次 ELISA 檢測結果中，4 種豆類皆無帶毒率。綠豆及敏豆在第一次子葉檢測中，各有 7 棵及 2 棵植株測得的數值介於 2 倍健康之猶豫值間，但在第 2 次真葉檢測時就無此情形產生 (表 2)。由出芽測試結果未測到 CpMMV-V，會透過綠豆與長豇豆或 CpMMV-P 會透過紅豆與敏豆之種子傳毒之情形。

電子顯微鏡觀察病毒型態

將感染病之毒長豇豆或敏豆葉片使用陰染法處理，以電子顯微鏡觀察 CpMMV-V 與 CpMMV-P 兩分離株的病毒顆粒形態 (圖 2)，可看到皆為長桿狀，長度約為 600 nm，此兩株分離株病毒顆粒型態符合 *Carlavirus* 病毒屬之特性。

表 2. 罹病植株採集之種子發芽率與種子帶毒率。

Table 2. The germination and transmission rates of seeds collected from CpMMV-infected plants.

Virus/plant[z]	Germination rate (%)[y]	Seed-transmissibility 1[x]	Seed-transmissibility 2[w]
CpMMV-P/Adzuki bean	74	0/74	0/74
CpMMV-P/French bean	72	7/72	0/72
CpMMV-V/Mung bean	69	2/69	0/69
CpMMV-V/Cowpea	62	0/62	0/62

[z] Seed-transmissibility: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of 100 seeds collected form infected plants.

[y] (Number of germination seeds/total number of seeds) × 100%.

[x] Detection of cotyledon: (number of infected seeds/total number of seeds) × 100%.

[w] Detection of compound leaf: (number of infected seeds/total number of seeds) × 100%.

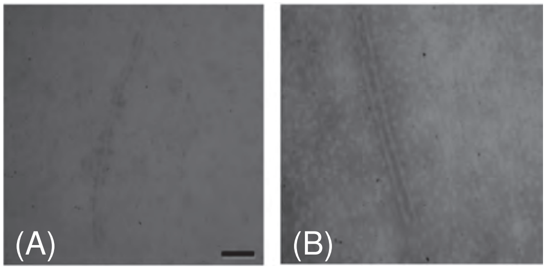

圖 2. 電子顯微鏡觀察豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 兩分離株之病毒顆粒。(A) CpMMV-V 分離株；(B) CpMMV-P 分離株。

Fig. 2. Electron micrographs of flexuous filaments viral particles of cowpea mild mottle virus (CpMMV) prepared by leaf-dip method. Bar represents 200 nm. (A) CpMMV-V isolate; and (B) CpMMV isolate P.

抗血清與抗體之應用

SDS 免疫擴散反應

透過 SDS 免疫擴散觀察 CpMMV-V 之抗血清與兩株分離株經 16 h 的免疫反應，結果可以看到 CpMMV-V、CpMMV-P 奎藜病汁液與抗血清間呈現同源正反應。二者與抗血清皆有沉澱帶產生，且沉澱帶互相融合，可以發現 CpMMV-M 與 CpMMV-G 間之親緣關係 (圖 3)。

間接式酵素結合免疫吸附反應測試最佳 IgG 使用濃度

將罹病奎藜葉片以 coating buffer 研磨，依序加入微量盤中完成披覆後，加入不同濃度 IgG (1.5 μg mL^{-1}、1.25 μg mL^{-1}、1 μg mL^{-1}、0.8 μg mL^{-1}、0.6 μg mL^{-1}) 反應，再加入 2 級抗體，完成呈色反應 (圖 4)。加入之 IgG 濃度高於 1 μg mL^{-1} 時，偵測 CpMMV-V 及 CpMMV-P 2 分離株吸收值都高於 1.0。未接種奎藜對照之吸收值低於 0.2，明顯可區分有無罹染 CpMMV。抗血清以純化 CpMMV-V 之鞘蛋白為抗原免疫白兔，因此在 ELISA 反應中，IgG 與 CpMMV-V 的反應讀值較 CpMMV-P 高。

西方漬染法

以西方漬染法進行分析採集自不同地點長豇豆樣本，其鞘蛋白分子量介於蛋白標誌 27–41 kDa 之間，推估其分子量約為 32 kDa

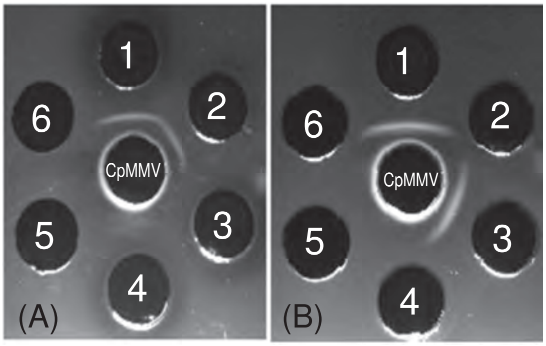

圖 3. SDS 免疫擴散法反應分析抗血清之免疫反應特性。中央穴：抗血清；周圍穴：分別添加經 SDS 處理之葉片汁液。(A) 1：CpMMV-V 奎藜病汁液；2：CpMMV-P 奎藜病汁液；3、4：未接種病毒之奎藜葉片汁液；5、6：無菌水。(B) 1：CpMMV-V 奎藜病汁液；3：CpMMV-P 奎藜病汁液；2、4：未接種病毒之奎藜葉片汁液；5、6：無菌水。

Fig. 3. Reaction of polyclonal antisera against cowpea mild mottle virus (CpMMV) in SDS-immunodiffusion test. Central well: polyclonal antisera of CpMMV; peripheral wells: SDS-treated antigens. (A) 1: CpMMV-V infected *Chenopodiun quinoa*; 2: CpMMV-P infected *C. quinoa*; 3 and 4: healthy tissues of *C. quinoa*; 5 and 6: sterile water. (B) 1: CpMMV-V infected *C. quinoa*; 3: CpMMV-P infected *C. quinoa*; 2 and 4: healthy tissues of *C. quinoa*; 5 and 6: sterile water.

(圖 5)，符合 CPMMV 之鞘蛋白分子量 (Naidu *et al*. 1998)。

CPMMV 二分離株鞘蛋白基因核苷酸之序列分析比對

罹病樣本抽取總量 RNA，利用偵測 Potyvirus 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1 (Pappu *et al*. 1998) 的進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% Agarose 電泳分析，意外觀察到增幅出 1.0 kb 之 DNA 產物 (圖 6)。增幅之 DNA 片段選殖至 pGEM-T 選殖套組，所得之選殖株經定序後，共有 965 個核苷酸，包含病毒之部分鞘蛋白基因、P6 基因和 3’ 非轉譯區。根據 CpMMV 之核苷酸序列於鞘蛋白基因設計專一性引子，配合上述 Pot1 引子進行 RT-PCR，DNA 產物加以選殖定序分析，得到全長度鞘蛋白基因，共含有 867 核苷酸轉譯成 289 胺基酸。其中，CpMMV-V 部分在 GenBank 登記為 Acc. No. JX070669，與巴西分離株 (DQ444266) 核苷酸相同度最高，達 98.7%；CpMMV-P (Acc. No. JX020701) 與中國分離株 (MN908944) 核苷酸相同度最高，達 94.7%，與其他 CpMMV 鞘蛋

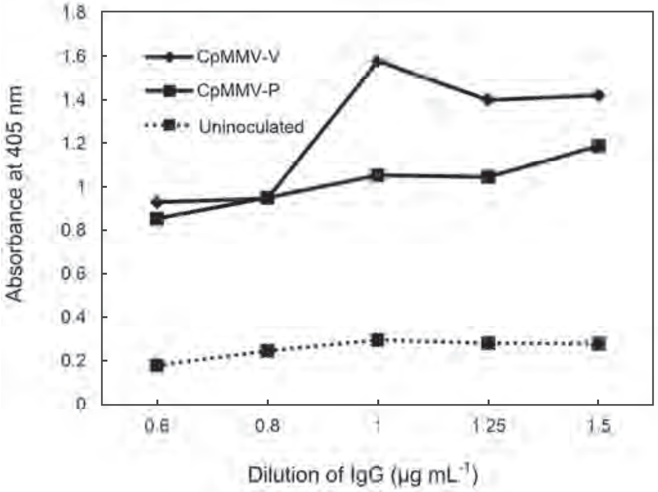

圖 4. 間接式酵素連結免疫吸附法檢測豇豆微斑駁病毒與不同 IgG 濃度 (1.50、1.25、1.00、0.80 及 0.60 μg mL^{-1}) 吸收值之影響。—◆—：接種 CpMMV-V 奎藜葉片；—■—：接種 CpMMV-P 奎藜葉片；··■··：未接種之奎藜葉片。

Fig. 4. Effect of concentration of immunoglobulin G (IgG) (1.50, 1.25, 1.00, 0.80, and 0.60 μg mL^{-1}) against cowpea mild mottle virus in enzyme-linked immunosorbent assay. The dilution ratio of plant sap and secondary antibody used in the assay were 1:30 (w/v) and 1:5,000 (w/v), respectively. —◆— : CpMMV-V infected *Chenopodiun quinoa*; —■— : CpMMV-P infected *C. quinoa*; ··■·· : Uninoculated *C. quinoa*.

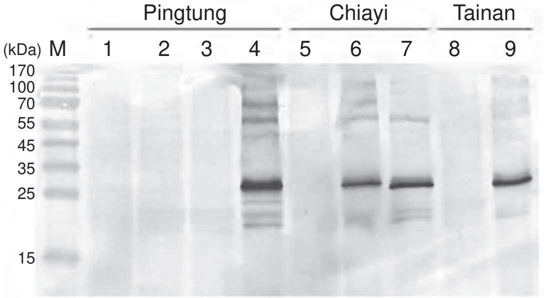

圖 5. 以西方漬染法偵測採集自屏東縣、台南縣及嘉義縣的長豇豆樣本是否感染豇豆微斑駁病毒。

Fig. 5. Detection of cowpea mild mottle virus (CpMMV) on infected asparagus bean plants by Western blotting. Antiserum against CpMMV coat protein was used to react with the crude saps extracted from the asparagus bean samples collected from Pingtung, Tainan and Chiayi Counties.

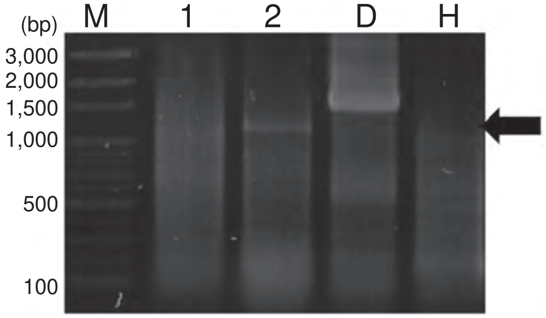

圖 6. 利用 potyviruses 的簡併式引子 (Hrp5/Pot1) 進行 RT-PCR 偵測豇豆樣本的增幅產物分析：豆類普通嵌紋病毒為正對照，增幅 1.3 kb DNA 產物 (D)；豇豆微斑駁病毒增幅 1.0 kb DNA 產物 (1, 2)；未感染的豇豆樣本為健康對照 (H)。

Fig. 6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with degenerate primers of potyviruses (Hrp5/Pot1) to detect cowpea mild mottle virus (CpMMV). Products of 1.3 kb DNA amplified from total DNA of bean common mosaic virus (BCMV) infected asparagus bean plant shown in lane D and 1.0 kb DNA amplified from cowpea mild mottle virus (CMMV) infected asparagus bean samples shown in lanes 1 and 2. Non-infected asparagus bean samples as healthy control shown in lane H.

白基因，核苷酸序列相同度介於 98.7–75.7%，胺基酸序列相同度介於 97.9–91.3% 之間。台灣 2 分離株之核苷酸相同度為 88.9%，胺基酸相同度為 97.6%，2 分離株僅有 6 個胺基酸不同，胺基酸相同度較核苷酸相同度大幅提高，國外分離株亦有此特性。將所有 CPMMV 分離株鞘蛋白序列繪製親源樹，觀察彼此之間的親源關係，其結果本試驗所獲得兩分離株分在不同一支群 (圖 7)。

討論

CpMMV 屬於 *Carlavirus* 屬，病毒顆粒呈長絲狀，長度約 620–700 nm，直徑為 12–15 nm。Menzel *et al*. (2010) 於加納長豇豆上分離出 CpMMV，其病毒型態，長度介於 620–660 nm 間，而本試驗之兩分離株透過電子顯微鏡下觀察，其形態與顆粒大小，皆與 *Carlavirus* 之 CpMMV 病毒型態相符合 (圖 2)。根據 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 針對 *Carlavirus* 屬內種的區分標準為，當 CP 或 replicase genes 核苷酸相同度小於 72%，或者是胺基酸相同度小於 80% 時，即為不同種病毒。從兩分離株之鞘蛋白進行比對，其核苷酸與胺基酸相同度達 88.8% 與 97.9%，此結果得到兩分離株確實為同種病毒不同作物之分離株。試驗中製備了多元抗血清，此抗血清不僅應用於 SDS 免疫擴散反應觀察病毒株之間鞘蛋白相關程度，用於西方漬染法觀察到病毒鞘蛋白分子量等病毒學上的證據，更可應用於間接式酵素結合免疫吸附反應。以目前 CpMMV 的 2 分離株鞘蛋白胺基酸相同度高達 97.6%，此抗血清應可順利檢出不同分離株之 CpMMV，適合用於進行田間調查，瞭解此病毒在台灣確實分布情形。

長豇豆與敏豆是台灣重要的豆科蔬菜之一，以往台灣感染豆科植株之病毒，主要以 CMV、BCMV、CAMV 等，其中又以 BCMV 與 CMV 複合感染所產生的危害最為嚴重 (Chang 1983)，且此 2 種病毒可以透過種子傳播，造成更廣泛的危害。我國之長豇豆健康種子繁殖制度已行之有年，大幅阻絕病毒危害 (Chang *et al*. 1994)。以往危害敏豆的病毒只有零星發生的 CMV，敏豆的病毒病害並不常見。近年的調查僅確知長豇豆與敏豆受到 CpMMV 危害 (Chang *et al*. 2013)，接種測試寄主範圍的試驗中，CpMMV 也感染花生、紅豆、皇帝豆、黃豆與豌豆等台灣常見作物，但

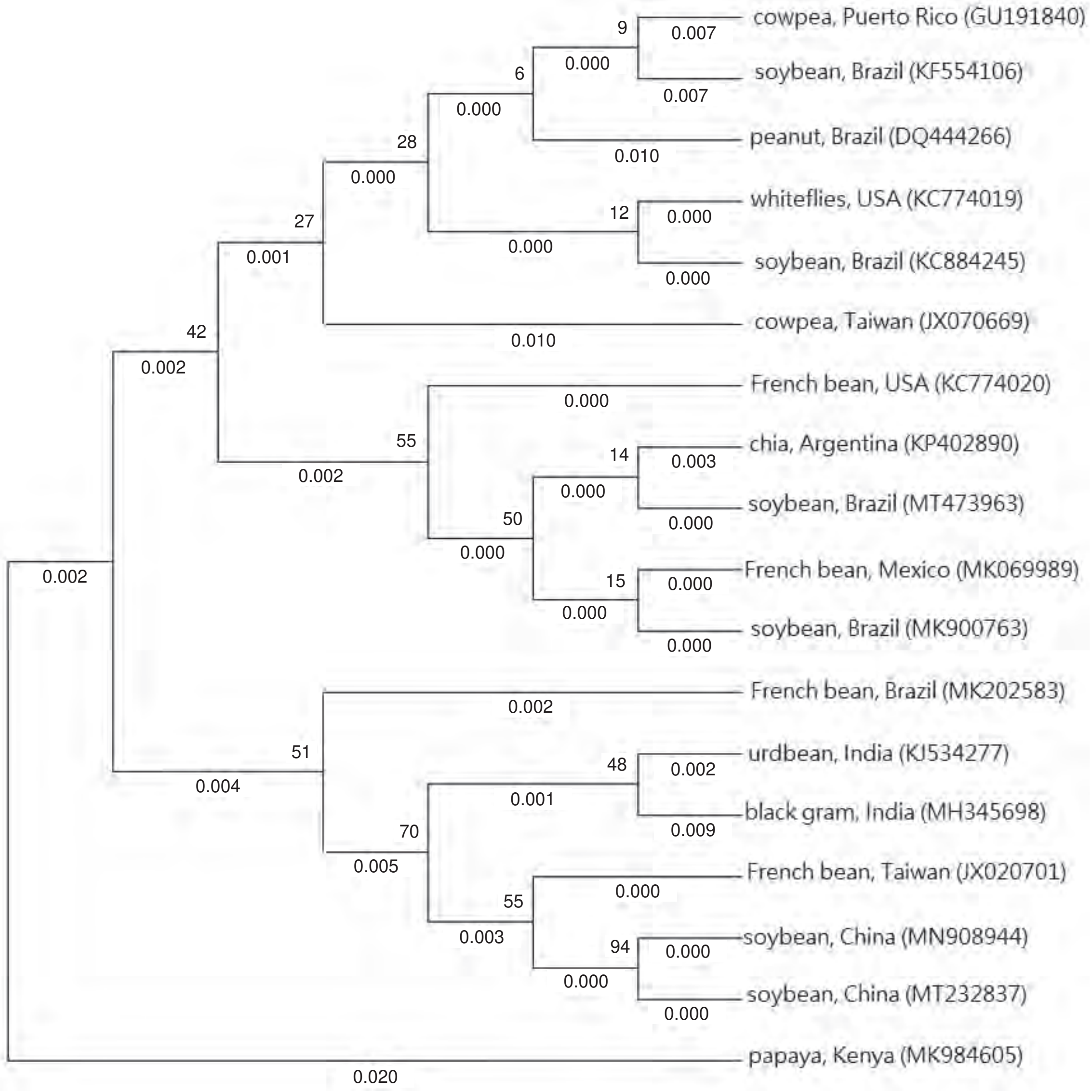

圖 7. 豇豆微斑駁病毒鞘蛋白基因親緣關係分析之樹狀圖。

Fig. 7. Phylogenetic relationship of coat protein gene of cowpea mild mottle virus (CpMMV). The tree was generated by neighborhood-joining method. The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications.

尚未在長豇豆與敏豆以外之豆科作物發現此一病毒。可能是田間病徵輕微被忽略，或是發生地點距離遠而躲過此病害，例如 CpMMV 常見於中部栽種的敏豆，高雄種植敏豆尚未測到此病毒。因此，栽培地區不同也可能限制 CpMMV 在其他豆類上之擴散。CpMMV 自然感染的寄主雖以豆科植物為主，但國外也有自然感染非豆科的番茄 (Brunt & Philips 1981)、茄子 (Mansour *et al*. 1998)、木瓜 (Mumo *et al*. 2020) 及芡歐鼠尾草 (Celli *et al*. 2016) 的報告，因此 CpMMV 在粉蝨密度高的台灣的發生擴展值得密切注意。

CpMMV 可以經由機械及媒介昆蟲粉蝨傳播，但一直未有明確證據證明 CpMMV 可以經

由種子傳播 (King *et al*. 2011)，直到 Barreto da Silva *et al*. (2020) 證明巴西的分離株感染特定品種大豆，病毒可經由種子傳播。種子傳播可大幅增加病毒遠距離傳播的能力。試驗中亦收集接種 CpMMV-V 之綠豆與長豇豆和帶有 CpMMV-P 之紅豆與敏豆的種子，各播種 200 顆種子測試發芽苗是否帶毒，試驗中並未測出病株。台灣分離株初步未觀察到可經由種子傳播，但 4 種作物均只各測試 1 個品種，台灣分離株是否種傳仍需要更廣泛測試。

台灣 2 分離株在寄主測試中可感染多數測試豆類，但除了敏豆之外，多數病徵輕微，容易被忽略。一旦在某豆科植株上帶有此病毒，就很容易藉由媒介昆蟲粉蝨在短時間內快速的散播開來，而造成大規模的蔓延，如中部地區在敏豆上造成之危害。本研究已建立的抗血清檢測方法如 ELISA，提供調查利器，藉由更多田間調查可以瞭解 CpMMV 在台灣不同豆科作物發生情形，作為建立防治策略之基礎。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 102 農科-10.1.2-農-C1(1)、103 農科-10.2.2-農-C2(4)、104 農科-10.7.2-農-C1(4) 計畫經費支持，更依賴多位研究同仁蔡佳芬、王昭萍、江芬蘭和蔡筱婷，以及當時研究生江佳典等共同協助完成，謹此致謝。

引用文獻

Anno-Nyako, F. O. 1986. Semipersistent transmission of an ‘extra mild’ isolate of cowpea mild mottle virus on soya bean by the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. in Nigeria. Trop. Agric. 63:193–194.

Antignus, Y. and S. Cohen. 1987. Purification and some properties of a new strain of cowpea mild mottle virus in Israel. Ann. Appl. Biol. 110:563–569. doi:10.1111/j.1744-7348.1987.tb04174.x

Barreto da Silva, F., C. Muller, V. H. Bello, L. F. M. Watanabe, B. Rossitto De Marchi, L. M. Fusco, M. R. Ribeiro-Junior, G. B. Minozzi, L. M. Vivan, M. A. Tamai, J. R. Farias, A. M. Nogueira, M. M. P. Sartori, and R. Krause-Sakate. 2020. Effects of cowpea mild mottle virus on soybean cultivars in Brazil. Peer J. 8:e9828. doi:10.7717/peerj.9828

Brito, M., T. Fernández-Rodríguez, M. J. Garrido, A. Mejías, M. Romano, and E. Marys. 2012. First report of cowpea mild mottle carlavirus on yardlong bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) in Venezuela. Viruses 4:3804–3811. doi:10.3390/v4123804

Brunt, A. A. and R. H. Kenten. 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. Ann. Appl. Biol. 74:67–74. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb07723.x

Brunt, A. A. and S. Phillips. 1981. ‘Fuzzy vein’, a disease of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Western Nigeria induced by cowpea mild mottle virus. Trop. Agric. 58:177–180.

Celli, M. G., M. C. Perotto, M. C. Merino, C. F. D. Nome, C. R. Flores, and V. C. Conci. 2016. First report of cowpea mild mottle virus in chia (*Salvia hispanica*). Crop Prot. 89:1–5. doi:10.1016/j.cropro.2016.05.014

Chang, C. A. 1983. Rugose mosaic of asparagus bean caused by dual infection with cucumber mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus. Plant Prot. Bull. 25:177–190. (in Chinese with English abstract)

Chang, C. A., D. E. Purcifull, and F. W. Zettler. 1990. Comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. Plant Dis. 74:593–596. doi:10.1094/PD-74-0593

Chang, C. A., T. T. Yang, T. M. Tsan, and C. C. Chen. 1994. Production and application of virus free seeds to control virus diseases of asparagus beans. Plant Prot. Bull. 36:313–325. (in Chinese with English abstract)

Chang, C. A., L. Y. Chien, C. F. Tsai, Y. Y. Lin, and Y. H. Cheng. 2013. First report of cowpea mild mottle virus in cowpea and French bean in Taiwan. Plant Dis. 97:1001. doi:10.1094/PDIS-10-12-0935-PDN

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen.Virol. 34:475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475

Demski, J. W. and C. W. Kuhn. 1989. Cowpea mild mottle virus. p.60–61. *in*: Compendium of Soybean Diseases. 3rd ed. (Sinclair, J. B. and P. A. Backman, eds.) American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 106 pp.

Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology 70:1028–1032. doi:10.1094/Phyto-70-1028

Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein

blotting. p.165–178. *in*: Methods in Molecular Biology™. Vol. 1. (Walker, J. M., ed.) Humana Press. Totowa, NJ. 355 pp. doi:10.1385/0-89603-062-8:165

Hall, C. E. 1964. Electron microscopy: Principles and application to virus research. p.253–266. *in*: Plant Virology (Corbett, M. K. and H. D. Sisler, eds.) Univ. Florida Press. Gainesville, FL. 527 pp.

Iizuka, N., R. Rajeshwari, D. V. R. Reddy, T. Goto, N. Muniyappa, N. Bharathan, and A. M. Ghanekar. 1984. Natural occurrence of a strain of cowpea mild mottle virus on groundnut (*Arachis hypogaea*) in India. J. Phytopathol. 109:245–253. doi:10.1111/j.1439-0434.1984.tb00714.x

Iwaki, M., P. Thongmeearkom, M. Prommin, Y. Honda, and T. Hibi. 1982. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. Plant Dis. 66:365–368. doi:10.1094/PD-66-365

Jeyanandarajah, P. and A. A. Brunt. 1993. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of cowpea mild mottle virus. J. Phytopathol. 137:148–156. doi:10.1111/j.1439-0434.1993.tb01334.x

King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2011. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier-Academic Press. San Diego, CA. 1338 pp.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Kuo, J. Y. 1995. Current status and prospects of leguminous vegetables industry in Taiwan. p.111–131. *in*: Proceedings of a Symposium on the Improvement of Vegetable Industry in Taiwan. December 1995. Taichung, Taiwan. Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Taichung City, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Mali, V. R. and D. D. Nirmal. 1987. Properties of a cowpea mild mottle virus isolate from groundnut. Indian Phytopathol. 40:22–26.

Mansour, A., A. Al-Musa, H. J. Vetten, and D. E. Lesemann. 1998. Properties of a cowpea mild mottle virus (CpMMV) isolate from eggplant in Jordan and evidence for biological and serological differences between CpMMV isolates from Leguminous and Solanaceous hosts. J. Phytopathol. 146:539–547. doi:10.1111/j.1439-0434.1998.tb04752.x

Menzel, W., S. Winter, and H. J. Vetten. 2010. Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. Arch. Virol. 155:2069–2073. doi:10.1007/s00705-010-0821-y

Mink, G. I. and C. L. Keswani. 1987. First report of cowpea mild mottle virus on bean and mung bean in Tanzania. Plant Dis. 71:557. doi:10.1094/PD-71-0557F

Mumo, N. N., G. E. Mamati, E. M. Ateka, F. K. Rimberia, G. O. Asudi, L. M. Boykin, E. M. Machuka, J. N. Njuguna, R. Pelle, and F. Stomeo. 2020. Metagenomic analysis of plant viruses associated with papaya ringspot disease in *Carica papaya* L. in Kenya. Front. Microbiol. 11:205. doi:10.3389/fmicb.2020.00205

Muniyappa, V. and D. V. R. Reddy. 1983. Transmission of cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a non-persistent manner. Plant Dis. 67:391–393. doi:10.1094/PD-67-391

Naidu, R. A., S. Gowda, T. Satyanarayana, V. Boyko, A. S. Reddy, W. O. Dawson, and D. V. Reddy. 1998. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus *Carlavirus*. Arch. Virol. 143:769–780. doi:10.1007/s007050050328

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125. doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1121

Purcifull, D. E. and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Tech. Bull. Fla. Agric. Exp. Sta. No. 788. Agricultural Experiment Stations, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, FL. 39 pp.

Reddy, D. V. R. 1991. Groundnut viruses and virus diseases: Distribution, identification and control. Rev. Plant Pathol. 70:665–678.

Rodriguez Pardina, P. E., J. D. Arneodo, G. A. Truol, P. S. Herrera, and I. G. Laguna. 2004. First record of cowpea mild mottle virus in bean crops in Argentina. Austral. Plant Pathol. 33:129–130. doi:10.1071/AP03076

Rosario, K., H. Capobianco, T. F. F. Ng, M. Breitbart, and J. E. Polston. 2014. RNA viral metagenome of whiteflies leads to the discovery and characterization of a whitefly-transmitted *Carlavirus* in North America. PLoS One 9:e86748. doi:10.1371/journal.pone.0086748

Shahraeen, N. 1989. Studies on a virus causing mosaic diseases of soybean (cv. MACS-13). Indian Phytopathol. 42:338.

Thouvenel, J. C., A. Monsarrat, and C. Fauquet. 1982. Isolation of cowpea mild mottle virus from diseased soybeans in the Ivory Coast. Plant Dis. 66:336–337.

doi:10.1094/PD-66-336

Tzeng, S. S. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung City, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Yadav, M. K., K. K. Biswas, S. K. Lal, V. K. Baranwal, and R. K. Jain. 2013. A distinct strain of cowpea mild mottle virus infecting soybean in India. J. Phytopathol. 161:739–744. doi:10.1111/jph.12119

Zanardo, L. G. and C. M. Carvalho. 2017. Cowpea mild mottle virus (*Carlavirus*, Betaflexiviridae): A review. Trop. Plant Pathol. 42:417–430. doi:10.1007/s40858-017-0168-y

Identification and Biological Characteristics of Cowpea Mild Mottle Virus in Taiwan

Ying-Huey Cheng[1,*], Chin-Chih Chen[1], Lan-Yi Chien[2], and Chin-An Chang[3]

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, L. Y. Chien, and C. A. Chang. 2021. Identification and biological characteristics of cowpea mild mottle virus in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):67–79.

Sample plants of asparagus bean and French bean bearing putatively viral symptoms were found in vegetable gardens in Chiayi and Nantou Counties, Taiwan. The symptomatic plants were mechanically inoculated to *Chenopodium quinoa* and two virus isolates, cowpea mild mottle virus (CpMMV)-V and CpMMV-P, were isolated after 3 times of single lesion isolation. The virus sources were established by inoculating local lesions to *C. quinoa* or *Nicotiana benthamiana*. By back-inoculation, plants of asparagus bean and French bean developed symptoms similar to those found in the field. When two isolates were inoculated on other legume crops, there was no obvious dwarfing or stunting in the whole plant, but some mild symptoms such as mottle and yellow spots can be seen on leaves. CpMMV has not been detected to be transmitted through seeds by growing out test. Total RNAs extracted from diseased asparagus bean and French bean used as templates, and reverse transcription-ploymerase chain reaction were performed with degenerate primers for potyviruses (Hrp5/Pot1). Unexpectedly, an 1 Kb of DNA product was amplified. Comparing with gene sequences on GenBank, sequences of this amplified DNA includes part of the 3'end of the coat protein gene of CpMMV. The complete coat protein gene was cloned with specific primers based on the reported sequences and then for sequence analysis. The coat protein gene of CpMMV-V (JX070669) and CpMMV-V (JX020701) shared 88.8% and 97.6% sequence identities of nucleotide and amino acid, respectively. Comparing with other coat protein genes of CpMMV, the nucleotide sequence identity is 98.7–75.7%, and the amino acid sequence identity is 97.9–91.3%. Electron micrographs showed that carlavirus-like particles were found in the leaf dips of infected asparagus bean and French bean samples. The coat protein obtained by partially purified viral particles and through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used for antiserum preparation. The antiserum was available for Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), especially are suitable for field detection and investigation. Therefore, we found that CpMMV is commonly infected French bean in middle Taiwan. In addition to asparagus bean and French bean, whether CpMMV affects other leguminous crops needs more investigation.

Key words: Cowpea mild mottle virus (CpMMV), Coat protein, Antisera.

Received: November 24, 2020; Accepted: December 23, 2020.
* Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editors

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Shan, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 70 No. 1 March 31, 2021

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330